



TITLE:

大腸菌転写終結因子 ρ の構造と機能に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

堀口, 大吾

CITATION:

堀口, 大吾. 大腸菌転写終結因子 ρ の構造と機能に関する研究. 京都大学, 1997, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1997-09-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3130677>

RIGHT:

大腸菌転写終結因子 ρ の
構造と機能に関する研究

京都大学大学院理学研究科（生物物理学専攻）

堀口大吾

目次

第一章 序論	2
第二章 材料と方法	
第一節 実験材料	1 6
第二節 実験方法	1 8
第三章 実験結果	
第一節 rho 蛋白質へのヒスチジン・タグの導入	2 6
第二節 NusG 蛋白質と rho 蛋白質との相互作用	3 7
第三節 化学修飾法による rho 蛋白質の高次構造解析	5 2
第四章 考察	
第一節 NusG と rho との相互作用	8 0
第二節 rho 蛋白質の高次構造	8 3
謝辞	9 4
参考文献	9 5
補遺	1 0 0

第一章 序論

転写終結研究の意義

遺伝子の本体が DNA であることが明らかとなり、その構造が解明され、さらに DNA の操作ができるようになって、生命現象は DNA あるいは遺伝子の言葉で記述されるようになった。それまでに知られていた様々な生命現象、あるいは病気といったものを支配する遺伝子が次々と明らかにされてきた。今やあらゆる生命現象が遺伝子の支配を受けているといっても過言ではないことが示されつつある。従って、遺伝子の研究を押し進めることが生命現象の解明につながるといえる。そのためにはどのような遺伝子が存在するのかということを知る必要が勿論ある。生命現象を支配する遺伝子はいったいどれほどあるのか。大腸菌では4000、ヒトでは10万といわれている。その全てを読みつくすことが現在世界中のいくつかの研究室で行われている。

しかし遺伝子を読み尽くしただけでは生命現象の解明には程遠い。すでに明らかのように、全ての遺伝子が常に発現している訳ではないからである。むしろ大部分の遺伝子は発現していない、すなわち不活性化状態にあると言える。必要なときに必要な遺伝子のみが活性化されている。それは発生の一時期であったり、ある特定の組織のみであったりする。いずれにせよ生命現象を分子レベルで捉える上で、遺伝子の発現制御の解明はそのもっとも重要な鍵となる。

DNA 上に蓄えられている遺伝情報は RNA への転写、さらに蛋白質への翻訳を通じて発現する。その間、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、輸送・分泌等の各ステップにおいてその発現が調節される。中でも、原核生物、真核生物を問わず、遺伝子発現の最初の段階である転写は発現制御の最も重要な段階であると言える。ことに原核生物の場合、転写と翻訳とが共役しているため、基本的には転写の制御が翻訳の制御を兼ねることになる。したがって転写制御が遺伝子発現制御の中心である。

転写の制御とは、いつ、どこで、どの遺伝子を、どれだけ転写するのか、あるいは、しないのかということ、すなわち転写の開始時期、多細胞生物の場合は転写が行われる組織、転写される遺伝子の選別および転写量の調節を意味する。転写は開始、伸長、終結の三つのステップに大きく分けることができ、いずれの段階においても、この転写の制御が行なわれうる。しかし転写開始の ON/OFF を制御することで、基本的にこれらを調節することが可能である。したがって転写開始の制御が転写制御の基本であると言える。

しかしながら転写終結の制御が遺伝子発現の制御に関与する例も報告されている。

多くのアミノ酸合成系のオペロンではプロモーターと最初の構造遺伝子との間に転写の減衰を引き起こすアテニュエーターと呼ばれる領域が存在し、細胞中に存在するアミノ酸の量に応じてアテニュエーターでの転写終結が引き起こされ、下流の構造遺伝子群の転写量が調節されている (Yanofsky, 1981; Kolter and Yanofsky, 1982)。また原核生物の場合、オペロン内部にナンセンス変異やフレームシフト変異あるいは転移因子の挿入がおこりその遺伝子の翻訳が中断したときにリボソームの解離に伴って、このときに限って出現する潜在的なターミネーターが転写終結を引き起こし、下流の遺伝子の無駄な発現を押さえる機構も知られている (Franklin and Luria, 1961; Ames and Hartman, 1963)。さらに λ ファージの遺伝子の中には抗転写終結因子の N 蛋白質や Q 蛋白質によって転写終結が抑制されて初めて転写がおこり発現する遺伝子の存在が知られている (Roberts, 1988)。 λ ファージの *int* 遺伝子を含むオペロンは制御蛋白質の違いにより転写終結位置が変化するが、このことによって転写産物の 3' 末端の構造に違いが生じ、その構造の違いが RNase III に対する感受性の違いを引き起こすことによって *int* 遺伝子の発現が調節されることも知られている (Gottesman *et al.*, 1982; Schmeissner *et al.*, 1984)。

また一般的に言って原核生物の場合、遺伝子間の距離が短いため下流の遺伝子の不用意な発現を防ぐという意味で、正確に転写終結が起こることは極めて重要である。

このように転写終結が正しい位置で起こること、および転写終結を引き起こさなく

することも細胞の生存にとって重要である。

したがって転写制御全体を見渡すためには、転写終結について知ることもまた必要である。

転写終結

転写終結とは、DNA、RNA、RNA ポリメラーゼからなる転写複合体が RNA 合成中に、特定の位置でその合成を停止し、合成してきた RNA を放出し、さらに RNA ポリメラーゼが DNA から解離する現象である。

転写終結の機構は大きく分けて二種類の様式に分けることができる。一つは転写複合体がそれ自体で終結を引き起こす様式。もうひとつは転写複合体に他の何らかの蛋白質因子が作用して転写終結を引き起こす様式である。

原核生物の転写終結機構は大腸菌 *Escherichia coli* においてよく調べられており、大腸菌において最もよく知られている転写終結因子は rho と呼ばれている。この因子に依存する転写終結は rho 依存性転写終結、依存しない様式は rho 非依存性転写終結と呼ばれる。

rho 非依存性転写終結では RNA ポリメラーゼが新たに合成している RNA の構造がことのほか重要であると考えられている。すなわち、この様式の終結は、一般に、合成されつつある RNA の塩基配列が、ヘアピン構造を形成しうる配列の後に U 塩基が続くような部位で引き起こされる。終結の起こるメカニズムは次のように考えられている。すなわち RNA ポリメラーゼが GC に富む二回転対称領域に到達するとポーズングを起こし、ついでそのすぐ下流に 6 つほどの A が続く領域が存在すると dA-rU の塩基対合が不安定なため RNA が結果的に放出される (Martin and Tinoco, 1980)。

rho 依存性転写終結は RNA 結合蛋白質である rho が合成されつつある RNA に結合することによって引き起こされる転写終結の様式で、本研究のテーマであり後に詳述する。

真核生物の転写は三種類の異なる RNA ポリメラーゼによって行われるが、その三種

類のポリメラーゼの転写それぞれに固有の転写終結機構が知られている。

PolI による転写終結は蛋白質因子に依存しない様式は知られていないが、蛋白質因子に依存する様式としてはマウスやヒトにおいて転写終結因子 TTF-I に依存するものが知られている。TTF-I は DNA 結合蛋白質で Sal box と呼ばれる 18bp から成る DNA 上の配列を認識して結合し転写終結を引き起こす (Grummt *et al.*, 1985, 1986; Bartsch *et al.*, 1988)。

PolII による転写終結のうち蛋白質因子に依存しない様式は DNA 上に T 塩基が連続する部位で引き起こされる。この配列はしばしば遺伝子中に存在し *in vitro* で他の因子が存在しない条件下ではその部位で実際転写終結が起こってしまう。従って *in vivo* で正常な転写のために、おそらくむしろ何らかの因子が抗転写終結を引き起こしているのではないと思われる。また、この様式の終結では大腸菌の場合と違って、RNA の二次構造は重要ではない。むしろ DNA が bending を起こすことの方が重要であると考えられている (Kerppola and Kane, 1990)。

PolII による転写終結のうち蛋白質因子に依存するものとしては、polyoma T antigen の CCAAT box 結合蛋白質によるものが知られている。これもまた DNA 結合蛋白質であるが詳細は不明である。

一方 PolIII による転写終結では蛋白質因子に依存しない様式は PolII の場合と同様 T 塩基の連続する部位において引き起こされる。この場合は連続する T 塩基の長さに比例して終結効率が上昇する。やはり PolII の場合と同様 RNA の二次構造は終結には重要ではない。

PolIII による転写の終結を引き起こす蛋白質因子としては La が知られている。この因子は U 塩基に富む RNA に結合して転写終結を引き起こす (Stefano, 1984; Gottlieb and Steiz, 1989)。この因子は ATPase/dATPase 活性と DNA-RNA/RNA-RNA ヘリカーゼ活性を持つという報告があり (Bachman *et al.*, 1990)、この点、本研究で対象としている大腸菌転写終結因子 rho と類似しており興味深い、その様な活性が再現しないという報告もある (Maraia *et al.*, 1994)。

本研究では以上のうち大腸菌の rho 依存性転写終結の分子機構を明らかにすることを目的に行われたものである。

rho 依存性転写終結

rho 因子は *in vitro* の RNA 合成実験において λ フェージ初期遺伝子転写の正確な終結を引き起こす因子として 1969 年に J. Roberts により発見された。その際、終結と共に RNA 鎖が DNA・RNA・RNA ポリメラーゼの複合体から放出されることから RNA 遊離因子という意味でギリシャ文字をあてて ρ (rho) 因子と名付けられた (Roberts, 1969)。

その後の探索から rho は *Escherichia coli* と同じグラム陰性菌である *Pseudomonas fluorescens* や *Neisseria gonorrhoeae* はもとよりグラム陽性菌の *Micrococcus luteus*、光合成細菌の *Chromatium vinosum*、スピロヘータ類の *Borrelia burgdorferi*、内生孢子形成菌である *Bacillus subtilis* など様々な細菌で見いだされており、細菌においては普遍的に存在する因子であろうと考えられている (Miloso *et al.*, 1993; Quirk *et al.*, 1993; Opperman and Richardson, 1994)。

遺伝学的な解析からは rho 因子をコードする遺伝子は大腸菌染色体上の 84 分の位置にあること (Ratner, 1976; Inoko and Imai, 1976)、この因子が菌の生育に essential であること (Das *et al.*, 1976; Inoko *et al.*, 1977) が示された。また、rho はその構造遺伝子の前にリーダー領域を持ち、そこに存在する rho 依存性転写終結部位を通じて autoregulation されていることが明らかとされている (Matsumoto *et al.*, 1986)。

rho 蛋白質の構造と機能

1983年には Pinkham and Platt によって rho 蛋白質は 419 アミノ酸からなるポリペプチド鎖で、分子量はおよそ 46kDa であることが示された (Pinkham and Platt, 1983)。その後の生化学的解析より、rho 蛋白質は N 末端の約 1/3 にわたる比較的無秩序な領域、中央部約 250 残基を占める α ヘリックスと β シートの繰り返した構造を持つ領域、残り

の α ヘリックスに富む領域というふうに大きく三つの主要なドメインに分けることができることが明らかにされた (図1)。

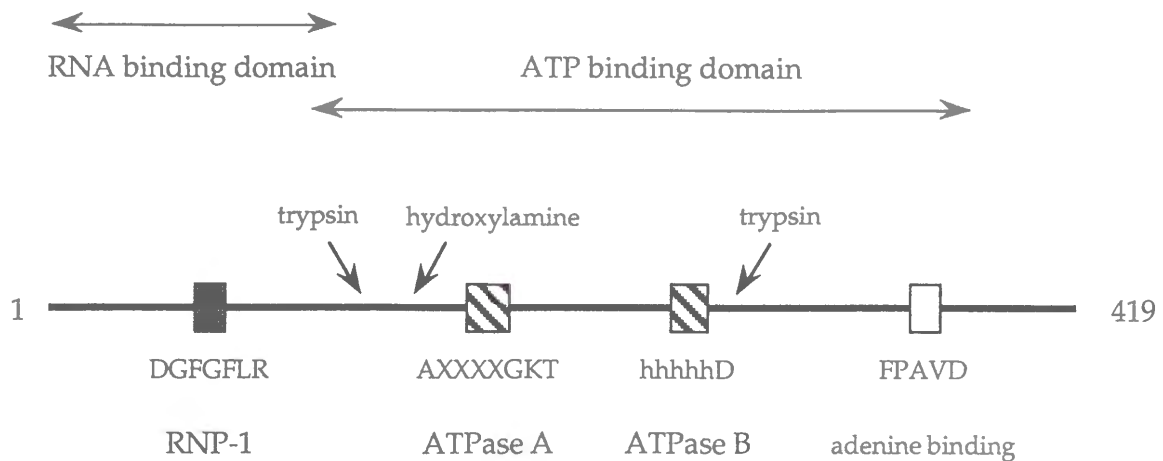


図1 rho 蛋白質のドメイン構造

このうち N 末ドメインは次のようにいろいろな証拠から RNA 結合を担うことが分かった。1) hydroxylamine を用いると rho 蛋白質は 151 番目のアスパラギンと 152 番目のグリシンの間で切断されるが、このうち N 末の 151 残基の方に poly(C) が結合する (Bear *et al.*, 1985)、2) UV クロスリンクでもこの部分に RNA が結合する (Dolan *et al.*, 1990)、3) この領域に変異のある rho 蛋白質は RNA との相互作用が野生型とは異なる場合が多い (Tsurushita *et al.*, 1989; Brennan and Platt, 1991)、4) そのなかの 61~64 残基の部分に RNA 結合蛋白質中に共通的に見いだされ RBD (RNA Binding Domain) -I と呼ばれているアミノ酸配列、G-F-G-F、を含む、5) この配列中のフェニルアラニンをアラニンやロイシンに変えると、RNA への結合能に変化が生じる (Brennan and Platt, 1991)。

また中央ドメインは F₁-ATPase の α および β サブユニットと有意な相同性をもつ (30%) ことから ATP の結合および加水分解反応を担うと考えられる。これは実際に次の観察により確証された。1) UV クロスリンクで ATP が hydroxylamine 切断断片の結合すること (Dolan *et al.*, 1990)、2) 178~185 残基の部分の領域中には多くの ATP 結合ドメイン NB-I (Nucleotido Binding Domain) に共通の配列、G-X-X-X-X-G-K-T があり ATP の類似体 (PLP-AMP) はこのなかの 181 番目のリジンに結合すること (Dombroski *et al.*, 1988)、3) この NB-I 中の K181 が Q に変化した変異 rho 蛋白質は ATP 加水分解活性を失うこと (Dombroski *et al.*, 1988b)、4) ATP 結合ドメインの第二の共通配列 NB-II、h-h-h-D (h は疎水生アミノ酸残基を表す) 中の D265 \rightarrow N の変異により ATP 加水分解活性を消失すること (Dombroski *et al.*, 1988a)。

最も C 末の領域については、これまで特定の分子活性との結び付きは示されていないが、この領域の欠失や変異によってしばしば rho 蛋白質が不溶性となったり菌が致死性的となったりすることから構造的あるいは機能的に重要な役割を果たしているものと考えられる。

このポリペプチド鎖はアミノ酸配列のアラインメントから F₁-ATPase との間に相同性があること (Dombrosli and Platt, 1988)、また両者の hydropathy profile を比較することから共に同じ起源の蛋白質である可能性が指摘されていたが (Opperman and Richardson, 1994)、その F₁-ATPase の結晶構造が近年明らかにされた (Abrahams *et al.*, 1994)。この ATPase は α および β サブユニットが交互に三つずつリング状に会合し、そのリングの中心に γ サブユニットが貫通した構造をしている。rho と相同性のあるのはこのうち α サブユニットと β サブユニットである。 α と β との相同性は identity が 25%、similarity が 50% とそれほど高くはない。にもかかわらず両者の三次構造は驚くほど酷似している。そして rho はこれら両サブユニットとやはり同程度の相同性を示す。しかしその類似しているアミノ酸部位は α と β とが類似しているところに一致しており、rho と F₁-ATPase の α および β サブユニットとは三次構造が類似している可能性が指摘されている (Miwa *et al.*, 1995)。

また、この蛋白質は超遠心を用いた沈降係数の測定で四量体ないし六量体をとることが示唆されたが (Finger and Richardson, 1982b)、RNA と共存させると、そのほとんどが六量体をとることから *in vivo* で機能するときには六量体をとるものと考えられた。その後、この蛋白質の四次構造に関しては、クロスリンク実験 (Finger and Richardson, 1982a)、電子顕微鏡による観察 (Oda and Takanami, 1972; Bear *et al.*, 1988; Gogol *et al.*, 1991)、および X 線散乱、X 線小角散乱、中性子散乱等のさまざまな物理学的手法により解析が進められ (Geiselman *et al.*, 1992a)、高塩濃度下では二量体を低塩濃度下では十二量体を形成しうるが、生理的な塩濃度の下では、六つのプロトマーが平面上にリング状に会合する六量体を形成することが明らかとされた。このリングは半径 24 Å の単量体が 6 つ、直径 138 Å のドーナツ状に会合しており中心部には直径 30 Å の穴があいた構造をしている (図2)。このような四次構造は上に述べた F₁-ATPase の α および

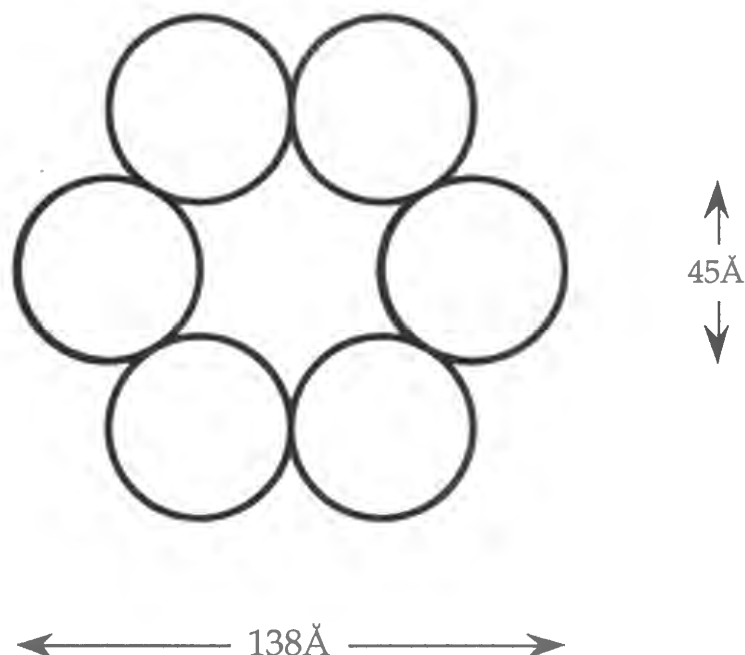


図2 rho 蛋白質六量体の構造モデル

β サブユニットが形成するリング状六量体と類似しており興味深い。

一方、この蛋白質が持つ機能としては NTP 結合能と RNA 結合能と、部分活性としての RNA 依存性 NTPase 活性と RNA-DNA ヘリカーゼ活性とをあげることができる (図3)。

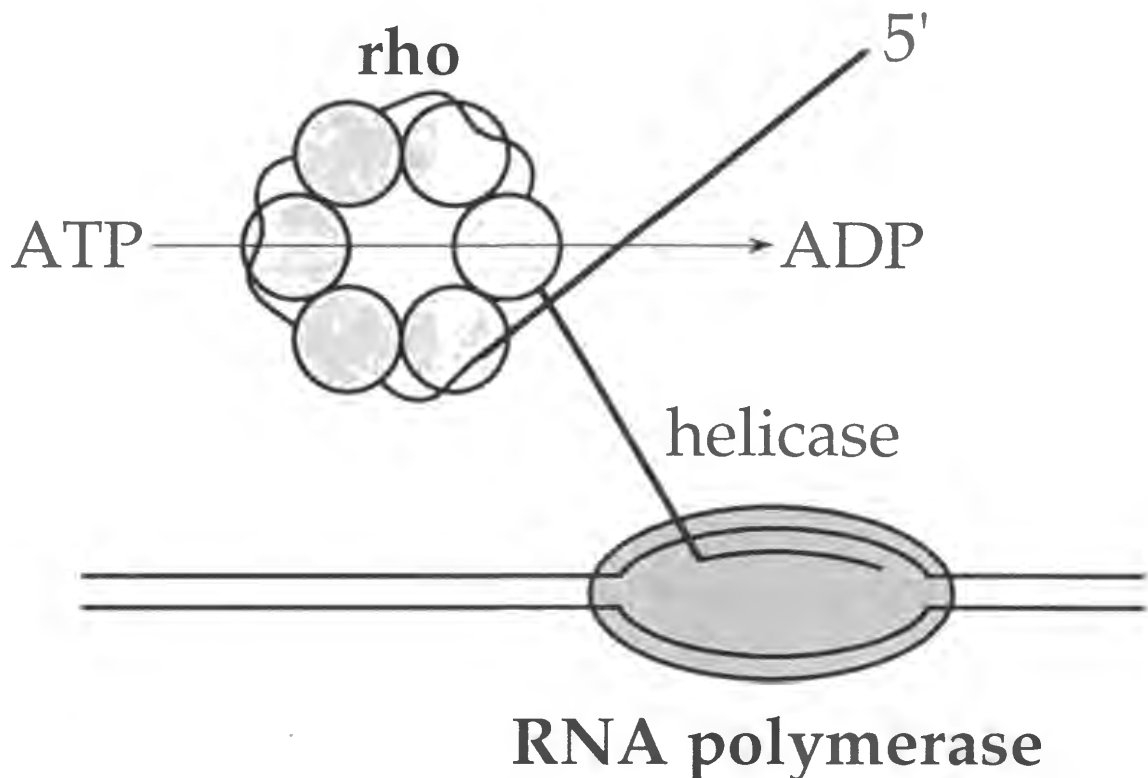


図3 従来の rho 依存性転写終結のモデル

部分活性のうち最も基本的な機能として注目されるのが RNA 依存性 NTP 加水分解活性である (Lowery-Goldhammer and Richardson, 1974)。この活性は *in vitro* では転写終結とは独立に観察することができる。しかし転写終結反応系に NTP の代わりに加水分解されない類似体 NMP-P(NH)P を用いると転写終結がおこらなくなることから、転写の終結には NTP 加水分解活性の必要ことが明かとされた (Howard and Crombrugghe,

1976)。NTP のなかでは ATP の K_m が最も小さく ($9\mu\text{M}$) rho 蛋白質は *in vivo* では ATPase として機能しているであろうと考えられている (Lowery and Richardson, 1977)。この NTP 加水分解活性は RNA 依存性であるが、コアクチベーターとする RNA の組成や配列によってその活性が異なる。最近の合成オリゴペプチドを用いた詳細な解析から C の含有量が 60% 以上であれば最大の NTP 加水分解活性がひきだされることが明らかとされた (Wang and von Hippel, 1993)。

さまざまな合成ペプチドを用いた rho ATP 加水分解活性の速度論的な解析から rho 蛋白質には 2 種類の核酸結合部位が存在することが示されている。それらはプライマリー部位、セカンダリー部位と呼ばれる。プライマリー部位は C に富む比較的長さの長い、約 60 塩基長の RNA、DNA のいずれとも結合することができる。ただし NTPase 活性を発揮するためにはこの他にオリゴ RNA を必要とする。一方セカンダリー部位は RNA とのみ結合し比較的短い、約 8 塩基長のヌクレオチド鎖に結合する (Richardson, 1982)。これら両サイトが rho 蛋白質のどこに実際に位置するのかは明らかとなっていないが、ひとつの仮説として rho 蛋白質の二量体が一つの機能単位を形成しこのうちの一方がプライマリー部位を担い、他方がセカンダリー部位を担うというモデルが提唱されている (Seifried *et al.*, 1992)。rho 六量体が全体としてどれだけの RNA に結合するのかということに関しては蛍光測定の利用から六量体あたり約 80 塩基長の RNA が結合すると考えられている (McSwiggen *et al.*, 1985)。これは丁度 rho 六量体の周りを一巻きする程度の長さになることから RNA は rho 六量体に巻き付くように相互作用するものと考えられている。この RNA 依存性 NTP 加水分解活性は先にも述べたように転写終結とは切り離された形でも生じるが、この活性が具体的にどのように転写終結と結びつくのか明快な説明はまだない。

もうひとつの活性として rho 蛋白質はヘリカーゼ活性、すなわち NTP の加水分解に依存して、DNA-RNA ヘリックスを解離させる機能を持つことが示されている (Brennan *et al.*, 1987)。この活性もまた ATP 加水分解活性と同様転写終結とは独立に起こりうる。環状 DNA とそれと部分的にハイブリッドを形成する一本鎖の RNA とを用

いることによって rho 蛋白質が実際に RNA 上を 5'→3' 方向に移動することが示されている。rho 蛋白質は RNA・DNA・RNA ポリメラーゼの三者の複合体から RNA を放出する活性があるが、このヘリカーゼ活性の発見でその基礎的な機構の一側面が明らかとなった。また NTP は六量体あたり三分子結合することが示唆されている。

rho と相互作用する因子

これまで述べてきた rho 因子の研究は *in vitro* で同因子が単独で示す分子機能を追及することに重点が置かれていた。しかし *in vivo* では rho 蛋白質は単独で働いているわけではなく他のさまざまな因子と相互作用し機能修飾されることが分かってきた。

近年 λ ファージの抗転写終結因子 N による抗転写終結活性を上昇させる因子の探索の中から新たに NusG 蛋白質が同定された (Sullivan and Gottesman, 1992; Li *et al.*, 1992)。これは、その存在自体は知られていたが、機能が不明 (unknown) であったため protein U と呼ばれていた蛋白質と同一であることが明らかとなった。さらに、この NusG 蛋白質を固定化したカラムに大腸菌の粗抽出液を通すと rho 蛋白質がこのカラムに結合することが分かった。そこで NusG 蛋白質が rho 依存性転写終結に関与している可能性が考えられ実際に *in vitro* 転写終結反応系に NusG を加えると通常ならば rho の活性がほとんど見られなくなる高塩濃度の条件下 (>0.2M KCl) で転写終結を顕著に回復させる作用を持つことが示された (Li *et al.*, 1993)。細胞内の塩濃度は 0.3M 程度と見積られているので、この結果は *in vivo* の状況を良く反映していると考えられる。また NusG を欠損させた大腸菌を用いた *in vivo* での実験から NusG は菌の成育に必須であり、また rho 依存性転写終結に必要であるか、もしくはそれを促進する働きのあることが明らかにされた (Sullivan and Gottesman, 1992)。しかしながら NusG が具体的にどのように rho 依存性転写終結に関与しているのかは不明である。

rho 依存性転写終結部位の構造

rho 依存性転写終結部位の構造はそれほど明確ではない。現在までに分かっていると

ころを総合すると、rho は二次構造を取り難く C 塩基に富む、翻訳されない RNA の領域を認識して相互作用する。通例その領域は RNA の3' 末端から100塩基ほど上流にある。従ってこのような RNA をコードする DNA 領域で、かつその後に転写終結に必要なポージングシグナルのある部位で転写終結が起これと考えられる。しかし、ポージングシグナルの本性についてはまだ良くわかっていない。rho 依存性転写終結部位のうち大腸菌の *trp* t' ターミネーターを用いた詳細な解析があるが、明確な終結シグナルは同定されていない。また共通の配列構造も見つかっていない。しかし、総括的に言えば、RNA 鎖上に、RNA ポリメラーゼが認識する何らかのポージングシグナルと、その上流に比較的 C 塩基に富み、かつ二次構造をとりにくい配列とがセットになって存在することが、rho 依存性転写終結に最低限必要であると考えられる。

転写終結部位の直接の認識は RNA ポリメラーゼによって行われる。しかし rho の変異体を用いることによって終結部位が微細に変化することから rho も転写終結部位の決定に何らかの寄与があるであろう (Tsurushita *et al.*, 1989)。rho はこのようなサイトを認識すると結合し、ついで RNA ポリメラーゼと相互作用し最終的に転写終結を引き起こすと考えられている。

rho 依存性転写終結のモデル

これらの知見をもとに考えられている rho 依存性転写終結のモデルには大きくふたつある (Platt and Richardson, 1992) (図4)。

一つは *looping model* と呼ばれ、rho 蛋白質が RNA 上の認識部位に結合した後、その結合を保持したまま RNA・DNA・RNA ポリメラーゼの複合体部位に作用し転写を終結させるというものである。rho 蛋白質と RNA とが結合すれば、転写終結部位近傍での rho 蛋白質濃度が相対的に上昇するため、転写複合体に相互作用しやすくなり、結果的に転写終結を引き起こすというモデルである。

もう一つは *tracking model* と呼ばれる。このモデルでは rho 蛋白質が RNA 上の認識部位に結合した後、ATP 加水分解のエネルギーを利用して RNA 上を 5'→3' 方向に進み、

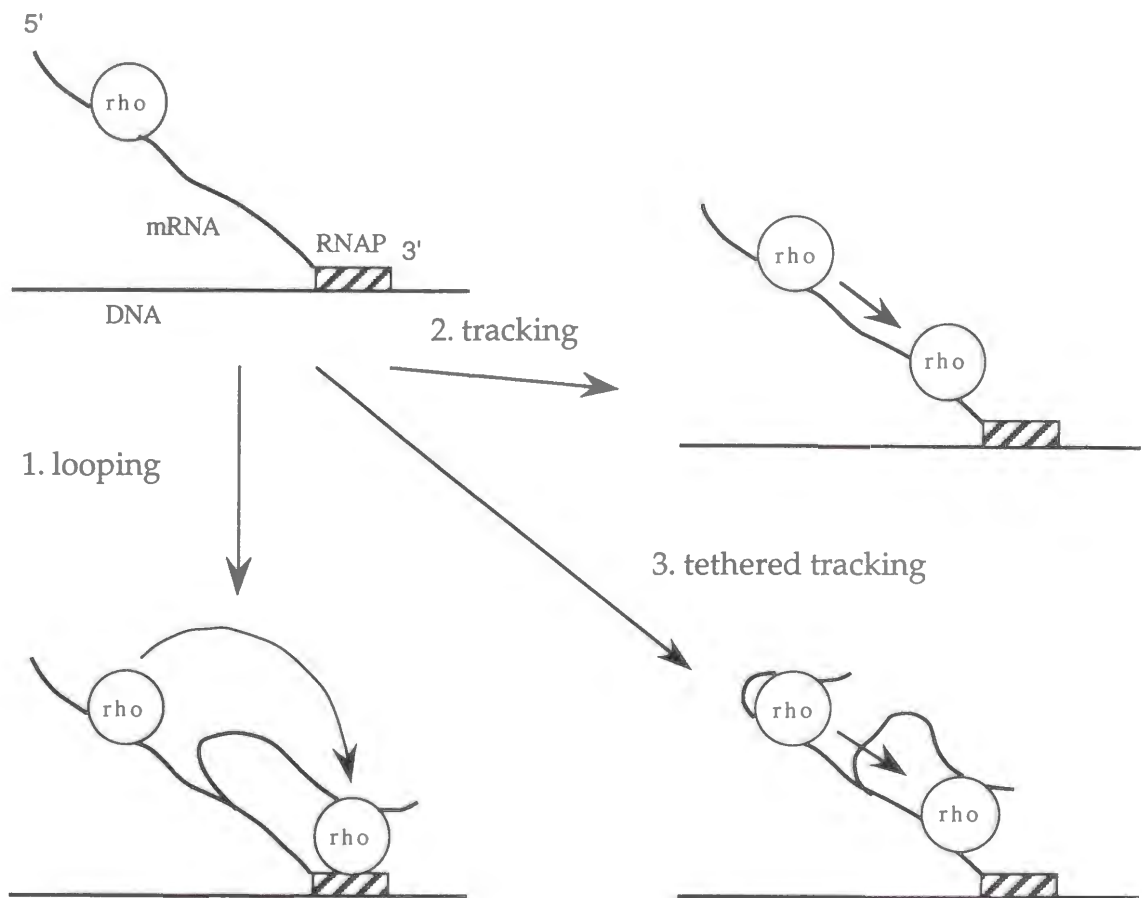


図4 rho 作用メカニズムのモデル

RNA・DNA・RNA ポリメラーゼの複合体部位に到達して転写終結を引き起こす。

先に述べたヘリカーゼ活性の実験より RNA 上を 5'→3' 方向に移動することが示されているので tracking model の可能性が強いように見える。しかしながらフットプリント実験から rho 蛋白質は最初に結合した RNA の部位との相互作用を維持したまま転写終結を引き起こす可能性が示唆されている。このことから上の二つのモデルを折衷した tethered tracking model、すなわち最初の結合は維持したまま RNA 上を 5'→3' 方向に移動し最終的に RNA・DNA・RNA ポリメラーゼの複合体部位に到達して転写終結を引き起こすという仮説が提唱され、現在最も有力と考えられている。

これまで述べたように rho 因子はいくつかの部分分子活性をもっている。これら個

別の活性を如何に組み合わせて転写終結を引き起こしているのかを明らかにすることは一つの大きな課題である。

rho と RNA とが相互作用することによって初めて ATPase 活性が生じる。また RNA 結合能 および ATPase 活性が組合わさって初めてヘリカーゼ活性が生じる。したがって rho 依存性転写終結のメカニズムを明らかにするためには、他因子との相互作用が如何に行われているのかを知ることが必要である。特に rho と RNA との相互作用は rho 依存性転写終結の最初のステップとして極めて重要である。また rho の NTPase 活性やヘリカーゼ活性も RNA と相互作用して初めてあらわれるものである。その意味で rho-RNA 相互作用を詳しく明らかにすることはまさに rho 依存性転写終結機構解明の中心的課題の一つであると言える。先に述べたように rho 蛋白質には RNA 結合部位が二種類存在するという仮説がある。しかしながらこれを直接示した証拠はない。果たして二種類の RNA 結合部位は本当に存在するのか、するとすればそれはどこか。

本研究においては特に rho の高次構造の解析を通して、rho と他因子との相互作用を検討した。

第二章 材料と方法

第一節 実験材料

菌株、及びプラスミド

本研究で使用した菌株は全て大腸菌 K12 株由来である。

また、本研究に用いたプラスミドのうち pNT203 は pSC101 由来でありテトラサイクリン耐性の表現型を示すが、他は全て pBR322 由来でありアンピシリン耐性の表現型を示す。

培地

L 培地は 1% tryptone、0.5% yeast extract、0.5% NaCl を含む。Terrific 培地は 1.2% tryptone、2.4% yeast extract、0.4% glycerol、2.3 g/l KH_2PO_4 、12.5 g/l K_2HPO_4 を含む。

LPG 培地は L 培地 にさらに 1% glucose、5.6g /l KH_2PO_4 、28.9 g/l K_2HPO_4 を含む。

SOB 培地は 2% tryptone、0.5% yeast extract、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10mM MgCl_2 、10 mM MgSO_4 を含む。SOC 培地は SOB 培地 にさらに 20mM glucose を含む。TFB は 100 mM KCl、45 mM MnCl、10 mM CaCl_2 、3 mM $(\text{NH}_2)_6\text{CoCl}_2$ を含む。これらの培地を固形培地として用いる場合にはさらに 1.5% Agar を加えた。

酵素、及び化学薬品

制限酵素、T4 DNA polymerase、Factor Xa は New England Biolab 社、寶酒造、東洋紡より、T4 DNA ligase は BRL 社より、Taq polymerase は Promega 社より購入したものを用了。ウサギ筋肉由来ピルビン酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、ホスホエノー

ルピルビン酸、 β -NADH、テトラサイクリンは Boehringer Mannheim 社より、ATP、GTP、UTP、CTP、ヘパリンセファロースは Pharmacia 社より購入したものをを用いた。DNaseI は PL 社より、 α - 32 P UTP は ICN 社より、DNA合成試薬類はクルアケム社より、Sep-Pak カラムは Waters 社より、 Ni^{2+} -NTA agarose は QIAGEN 社よりそれぞれ購入したものをを用いた。クマシーブリリアントブルーR は Sigma 社より、アンピシリンは明治製薬より、tryptone、yeast extract は Difco 社よりそれぞれ購入した。クロスリンク剤の DSS、DSG、sulfo-DST、sulfo-BSOCOES は Pierce 社より、DMS、DMP および DFDNB はナカライテスクより購入した。特に記さないかぎり他の化学薬品は和光純薬工業、あるいはナカライテスクより購入したものをを用いた。

表1 使用した菌株

<i>E. coli</i>	Genotype	Source or reference
BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (<i>lcl</i> 857, <i>ind</i> 1, <i>Sam</i> 7, <i>nin</i> 5, <i>lac</i> UV5-T7 <i>gene</i> 1)	Studier and Moffatt, 1986
DH1	<i>supE</i> 44, <i>hsdR</i> 17, <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyr</i> 96, <i>thi</i> -1, <i>relA</i> 1	Hanahan, 1983
HB101	<i>supE</i> 44, <i>hsdS</i> 20 ($r_B^- m_B^-$), <i>recA</i> 13, <i>ara</i> -14, <i>proA</i> 2, <i>lacY</i> 1, <i>galK</i> 2, <i>rpsL</i> 20, <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1	Bolivar and Backman, 1979
XL1-Blue	<i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 46, <i>thi</i> , <i>hsdR</i> 17, <i>supE</i> 44, <i>relA</i> 1, <i>lac</i> / F, [<i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15::Tn 10 (<i>tet</i> ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987

第二節 実験方法

DNA 操作および大腸菌操作

一般的な DNA 操作および大腸菌操作は Ausubel *et al.* (1994) あるいは Maniatis *et al.* (1989) の方法に準拠して行なった。制限酵素の反応は特に記さない限り供給先の指示に従って行った。

細胞抽出液の調製

細胞培養液 1.5ml に NaN₃ を 10mM になるように加えて菌の増殖を止め、遠心によって集菌し、これに 1Klett OD 当たり 1 μ l の SDS-sample buffer (125mM Tris-HCl, 2% SDS, 20% glycerol, 250mM β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenolblue, pH 6.8) を加えた。100℃で2分間加熱した後これを 15Krpm で 15 分間遠心して、得られた上清を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の試料とした。

外来 DNA による大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換はまず 200 μ l の competent cell にプラスミド DNA を加えて 0℃で 30 分間静置した。この後 42℃に 90 秒間置き直ちに再び 0℃に移して、これに SOC を 0.8ml 加え、37℃で 1 時間培養した後、これを適当な薬剤を含む固形培地にまくことにより行なった。

competent cell の作成はカルシウム法 (Morrison *et al.*,) または Hanahan の方法 (Hanahan, 1983) に基づいて行なった。

オリゴ DNA 合成と精製

オリゴ DNA は Milligen Bioserch Cyclone Plus を用いて合成した。得られた最終溶液は 55℃で 8 時間脱保護基反応を行なった後 10mM になるように Tris を加えてから遠心

乾固し、これを 100mM TEAA に溶かして、100% AcCN と 100mM TEAA とで平衡化した Sep-Pak カラムを用いて精製した。

合成した相補的な二本のオリゴ DNA (a, b) の塩基配列とそれがコードするアミノ酸配列は以下の通りである。

a: 5'-TATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACATCGAAGGTCG

b: 3'-ACTCTCCTAGCGTAGTGGTAGTGGTAGCTTCCAGCAT

アミノ酸配列：N末-MSGSHHHHHHIEGR

電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli の方法 (Laemmli, 1970) または Weber & Osborn (Weber & Osborn, 1969) の方法にしたがって行なった。

ポリアクリルアミド尿素ゲル電気泳動は Calva らの方法 (Calva et al., 1980) にしたがって行なった。buffer としては TBE buffer (89 mM Tris-Base, 89 mM borate, 2.5 mM Na₂EDTA, pH 8.3) を使い、泳動後のゲルは濾紙 (Whatman 3MM) に吸着させ乾燥後オートラジオグラフィーにより解析した。

アガロースゲル電気泳動は Davis らの方法 (Davis et al., 1980) にしたがって行なった。buffer には 0.5μg/ml 臭化エチヂウムを含む TAE buffer (40 mM Tris-Base, 20 mM 酢酸, 2 mM Na₂EDTA, pH 8.0) を用いた。

蛋白質の定量

rho 蛋白質は 280nm での吸光度より、比吸光度 $E_{1\%} = 3.7$ (Finger and Richardson, 1981) として計算した。他の蛋白質については Bovine serum albumin をスタンダードとして BCA 法によって決定した。

rho 蛋白質の精製

rho 蛋白質の精製は以下の通り行なった。

1) 細胞増殖

目的とする rho 蛋白質 (wild type あるいは mutants) を発現し得るプラスミドをもつ菌 (XL1-Blue あるいは HB101) を 50 µg/ml ampicilline, 12 µg/ml tetracycline を含む L 培地 2 ml 中で一晩培養する。ここから 0.5ml を同じ濃度の薬剤を含む 50 ml の L 培地あるいは terrific 培地に移し Klett OD が 100 になるまで 37°C (XL1-Blue) あるいは 32°C (HB101) で培養した。XL1-Blue 株に組み込んだ rho 蛋白質発現用プラスミドは lac プロモーターをもち培養液に IPTG を加えることによってその発現を誘導することができる。一方 HB101 株は λ PL プロモーターをもつ rho 蛋白質発現用プラスミドの他に制御用プラスミド pNT203 をもち培養温度を 32°C から 42°C に移行させることによって rho 蛋白質の発現を誘導することができる。そこで Klett OD が 100 になった培養液について XL1-Blue 株の場合には 1mM になるように IPTG を加えて、HB101 株の場合には培養温度を 42°C に移すことによってそれぞれ発現誘導をかけて、さらに培養を続けた。十分に誘導がかかった時点で培養液に 10 mM になるように NaN₃ を加えて菌の増殖を止め直ちに氷上で冷却したうえで遠心によって菌体を回収した。

2) 溶菌

菌体を ND1 buffer (10 mM Tris-HCl, 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 0.8 mM imidazole, 20% glycerol, 1 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) 5ml に懸濁し、ここに 10 mg/ml lysozyme を 120µl 加えて氷水上で 20 分間静置した後 1M NaCl を 500µl、1M MgCl₂ を 50µl、2mg/ml の DNaseI を 10µl 加えたうえで 2 分間の超音波処理を行なった (BRANSON, MODEL W185E)。この後遠心を行ない (11Krpm, 15 分間) 上清を回収した。

3) Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィー

ND1 buffer で平衡化した 0.5ml の Ni-NTA アガロースカラムに 2) で得られた試料を添加し ND2 buffer (10 mM Tris-HCl, 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20% glycerol, 1 mM β -mercaptoethanol, 0.02 mM PMSF, pH 8.0) 4.4ml で洗浄した後 ND3 buffer (10 mM Tris-HCl, 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 40 mM imidazole, 20% glycerol,

1mM β -mercaptoethanol, 0.02 mM PMSF, pH 8.0) 6ml で吸着力の弱い蛋白質を溶出した。次いで ND4 buffer (10 mM Tris-HCl, 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 250 mM imidazole, 20% glycerol, 1 mM β -mercaptoethanol, 0.02 mM PMSF, pH 8.0) を 6 回にわけて合わせて 6ml 用いて吸着力の強い蛋白質を溶出しこの 6 画分のうち rho 蛋白質が含まれている画分を SDS-PAGE によって判別し、その画分を集めてヘパリンセファロースカラムにかける試料とした。

4) ヘパリン・セファロースカラムクロマトグラフィー

3) で得られた画分に当量の G buffer (50 mM HEPES-KOH, 5 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 20% glycerol, pH 7.5) を加え G buffer で平衡化した 0.4ml のヘパリン・セファロースカラムに添加した。この後 G buffer 200 μ l で洗浄し、0.2M NaCl を含む G buffer 800 μ l で吸着力の弱い蛋白質を溶出し、さらに 6 回に分けて 1M NaCl を含む G buffer で残っている蛋白質を溶出した。それらのうち rho 蛋白質を含む画分を SDS-PAGE によって判別し、その画分を集めて rho 保存 buffer (50 mM HEPES-KOH, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 0.1 mM DTT, 50% glycerol, pH 7.5) に対して透析して -20℃で保存した。

rho ATPase 活性の測定

重定らの方法 (Shigesada *et al.*, 1984) に基づいて行なった。反応は 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 25 mM KCl, 0.1 mM DTT, 0.3mg/ml BSA, 0.1 mM ATP, 0.1mM β -NADH, 0.2 mM phosphoenolpyruvate, 1 unit pyruvate kinase & lactate dehydrogenase, 10ng/ μ l poly(C), 6ng/ml rho, 30℃の条件下で行なった。操作は以下の通りである。まず ATP, poly(C), rho を除く反応液 (97ml) をあらかじめ 30℃に保温しておき、ここに 1mg/ml ATP を 1 ml、0.3mg/ml rho を 2 ml、1mg/ml poly(C) を 1ml、この順序で加え、340nm の NADH の吸光度の時間変化を 恒温槽をつないだ分光光度計 (Shimadzu UV-240) を用いて測定した。

RNA 依存性 rho ATPase 活性は 1 mg の rho が 1 分間あたりに加水分解する ATP の nmol量として表すこととし次式に従って求めた。

$$\begin{aligned}\text{ATPase activity} &= ([\text{ATP}]_0 - [\text{ATP}]_t) / t / \rho \\ &= (A_{340,0} - A_{340,t}) / \epsilon_{340} / t / \rho\end{aligned}$$

ここで $[\text{ATP}]_0$ 、 $[\text{ATP}]_t$ は時刻 0 および t の ATP のモル濃度を、 t は時刻 t までの反応時間を、 ρ は rho 蛋白質の mg 量を、 $A_{340,0}$ 、 $A_{340,t}$ は時刻 0 および t における 340nm での吸光度を、 ϵ_{340} は NADH の 340nm での分子吸光係数をそれぞれ表す。

クロスリンク

EDC によるクロスリンクは 50 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 100 mM KCl, 20% glycerol 存在下で 0.5 mM rho と 5 mM NusG におよそ 2 mM になるように EDC と NHS とを加え、25℃ で 30 分間反応させて行った。反応は glycine を加えて停止し、TCA 沈殿の後、SDS-PAGE によって解析した。

imidoester によるクロスリンクは 45 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 200 mM KCl, 1 mM EDTA 存在下で 5 μ M rho におよそ 25 mM になるように imidoester を加え 20℃ で一定時間反応させて行なった。

N-hydroxysuccinimido ester によるクロスリンクは 45 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 200 mM KCl, 1 mM EDTA 存在下で 5 μ M rho におよそ 2 mM になるようにクロスリンカーを加え 20℃ で一定時間反応させて行なった。

DFDNB によるクロスリンクは 45 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 200 mM KCl, 1 mM EDTA 存在下で 5 μ M rho におよそ 20 mM になるようにクロスリンカーを加え 20℃ で一定時間反応させて行なった。

クロスリンカーは加水分解するので、実験のたびに新たに調製したものを用いた。imidoester 類は 50 mM HEPES-KOH, pH 7.9 に溶解し、その都度 KOH によって pH を 8 に合わせた。他の架橋剤は DMSO に溶解したものをを用いた。

反応はあらかじめ 20℃ の保温しておいた反応液に架橋剤の溶液を加えることで開始し、一定時間反応させた後、終濃度が 0.36 M になるように ethanolamine を加えて停止した。反応溶液は TCA 沈殿をせずに、等量の SDS サンプルバッファーを加え、そのま

ま SDS-PAGE により解析した。

hydroxylamine によるクロスリンクされた rho 蛋白質の切断

2 M Tris-HCl, pH 9.0, 1.7 M ethanolamine, 2M LiOH, 0.2% SDS, 45℃ の条件下で 5 時間、クロスリンクされた rho 蛋白質の切断を行なった。反応は終濃度が 0.5M になるように酢酸を加えて停止し、TCA 沈殿後 SDS-PAGE により解析した。

NusG 蛋白質の精製

NusG 蛋白質の精製は以下の通り行なった。

1) 細胞増殖

NusG 発現用プラスミド pNS8 と T7 lysozyme を発現するプラスミド pLysE とをもつ BL21(DE3) 株を 50 µg/ml のアンピシリンを含む L 培地 10 ml で一晚培養し、これを同様の薬剤を含む 1l の L 培地に移し Klett OD が 100 になるまで 37℃ で培養した。ここに IPTG を 0.5 mM になるように加えて、さらに NusG 蛋白質増産の誘導が十分にかかるまで培養を続けた。この後 NaN₃ を 10 mM になるように加えて菌の増殖を止め、遠心によって集菌した。

2) 溶菌

以下の操作は全て 0~4℃ で行なった。

得られた菌に 1 g 当たり 5 ml の D buffer (20 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20% glycerol, pH 8.0) を加え 5 分間の超音波処理を行ない、次いで 20 mM になるように MgCl₂ を、40mg/ml になるように DNaseI を加えて氷水上に 1 時間静置した。不溶性物質は遠心によって除去し上清を回収した。(分画 A)

3) PolyminP 分画

分画 A に 10% PolyminP を加え氷水上に 10 分間静置した後さらに遠心し核酸を沈殿として取り除いた (分画 B)。なお PolyminP の至適濃度は溶菌液ごとに異なる (Finger and Richardson, 1981) ので本操作に先立ち溶菌液の一部を取りそこに 0.2%~1% の

PolyminP を加え 10 分間氷水上に静置した後遠心し上清の 260nm の吸光度が急激に減少する濃度を求め、その濃度で残りの溶菌液の分画を行なった。

4) 硫酸分画

分画 B に 50% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えさらにアンモニア水を用いて pH を 7.5 にあわせた。これを攪拌しながら 4℃で一晩置いた後遠心し得られた沈殿を D buffer に懸濁した。次いでこれを Sephadex G-25 のカラムに通して脱塩した。この際、溶出画分の電気伝動度を測定して脱塩が完全であることをチェックした (分画 C)。

5) Q-Sepharose カラムクロマトグラフィー

分画 C を 50 mM NaCl を含む D buffer で平衡化した Q-Sepharose カラム (1.6 x 10cm) に添加した後、50 mM~287.5 mM の NaCl 直線濃度勾配で溶出した。分取した画分を 10ml ずつ SDS-PAGE にかけて、NusG が含まれている画分を検出した (分画 D)。

6) ヘパリンカラムクロマトグラフィー

分画 D を D buffer に対して一晩透析しこれを 25mM KCl を含む D buffer で平衡化したヘパリンカラムに添加した後 25 mM~200 mM の NaCl 直線濃度勾配で溶出した。分取した溶出液を SDS-PAGE にかけて NusG が含まれている画分を検出し、その画分を集めて NusG 保存 buffer (10 mM Tris-HCl, 2.0mM MgCl₂, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM DTT, 50% glycerol, pH 7.5) に対して透析し -80℃で保存した。

in vitro RNA 合成

標準反応液 (20μl) は 40 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 8% glycerol, 0.1 pmol 鋳型 DNA, 0.2pmol RNAPolymerase, 0.2mM ATP,CTP,GTP, 0.4 mM UTP, 2μCi [α -³²P] UTPおよびそれぞれの実験ごとに記した濃度の KCl, MgCl₂, rho 蛋白質を含む。

反応は 37℃で 10 分間保温した基質を含まない反応液に基質 (NTP) および rho 蛋白質を加えることにより開始した。転写反応の反復開始を防ぐため 0.2 μg rifampicin も同時に加えた。37℃で 20 分間反応を行なわせたあと 16μl の stop buffer (deionized formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol, 20 mM EDTA) を加えて反応を

停止した。80℃で2分間加熱した後氷水に移して急冷し、ポリアクリルアミド尿素ゲルで展開しオートラジオグラフィーにより解析した。

実験結果

第一節 rho 蛋白質へのヒスチジン・タグの導入

his-tagged rho 発現用プラスミドの作成

蛋白質の構造機能相関について調べる一つの有力な手法はその蛋白質の変異体を分離し、その機能変化を構造に照らし合わせながら比較検討することである。私の所属する研究室では、rho 蛋白質の構造機能相関について調べるため、これまでに遺伝学的手法ならびに生化学的手法をもちいて rho 蛋白質の変異体を多数分離してきた (Inoko *et al.*, 1977; Miwa *et al.*, 1995)。従来の遺伝学的解析から一步踏み込んで、より詳細に rho 蛋白質の構造と機能との連関について知ろうとするなら、これら変異 rho を精製して rho のもつ様々な活性のどこに欠損があるかを生化学的に解析する必要がある。

これまでは、それぞれの変異 rho 蛋白質をコードする遺伝子を発現用プラスミドに組み込み、そのプラスミドを大腸菌に導入し、増産誘導をかけることによって蛋白質を得、さらにこうして得た rho 蛋白質を一種類ずつ FPLC を用いて精製していた。しかしこれでは多種の変異蛋白質の全てを精製するのには相当な手間がかかる。また、このようにして増産させた変異 rho 蛋白質を従来の方法で精製すると大腸菌ゲノム由来の野生型 rho 蛋白質が必ず混入し、その後の厳密な解析に支障を来す可能性がある。とりわけ増産誘導のかかりにくい変異体を完全に分離しようとするなら、なおさらである。

これらの問題を解決するために、rho 蛋白質にヒスチジン・タグを導入することにした。6個のヒスチジン残基のクラスターを蛋白質の N 末あるいは C 末に結合することによって、ヒスチジン残基のイミダゾール基の窒素がニッケルに配位結合することを

利用してその蛋白質を精製することができる (Hochuli *et al.*, 1987,1988)。イミダゾール基とニッケルの親和性は特異性が極めて高いので、この方法を利用すれば目的とする蛋白質を粗抽出液からでも容易にかつ高純度に精製できるものと予想された。また、この方法では大腸菌ゲノム由来の野生型 rho 蛋白質を排除した形で変異 rho 蛋白質を精製できると期待された。さらにヒスチジン・タグを導入することによって、この蛋白質の固相への固定化や、標識等が可能となり新たな実験を組むことが可能となる。例えばニッケルを固定化したカラムにヒスチジン・タグを付けた rho 蛋白質を結合させることによって、いわば rho 蛋白質固定化カラムを作成し、これを利用して rho 蛋白質と相互作用する他の因子を検出できる可能性も考えられる (Gamer *et al.*, 1992)。

そこでまず、既存の rho 発現ベクター pEC22 から出発して、ヒスチジン・タグ (以後、単に「タグ」と省略) の付いた rho 蛋白質を増産できるように改造することを試みた (図5)。pEC22 は Plac プロモーター、 λ tR1 ターミネーター、野生型 rho 蛋白質構造遺伝子、rmBT1 ターミネーターをこの順序で持つ。このうち λ tR1 ターミネーターは非発現誘導時のプロモーターからの弱い転写活性の抑制、および変異 rho 蛋白質のスクリーニングの為に挿入されたものである (Miwa *et al.*, 1995)。このプラスミドの rho 蛋白質構造遺伝子の直前にある NdeI 認識部位に、6つのヒスチジン残基と Factor Xa の認識アミノ酸配列 (I-E-G-R) とをこの順序でコードする 42mer のオリゴ DNA を挿入した。

このようにして作成したプラスミド pNS3 を XL1-Blue 株に導入して IPTG の添加による rho 蛋白質の増産誘導を試みたが大腸菌粗抽出液の SDS-PAGE ではその増産は確認できなかった。もともと野生型 rho 蛋白質は強い転写終結活性を示すため pEC22 上において発現誘導をかけても、発現した rho 蛋白質が λ tR1 ターミネーターで自分自身の発現抑制をするため目に見える強い発現誘導は期待できない。同様に pNS3 においても、もしタグ付き rho 蛋白質の転写終結活性が野生型とあまり変わらなければ、やはり発現抑制がかかると考えられる。

そこで次に Plac プロモーターより強い転写開始能をもつ PL プロモーターを Plac プロ

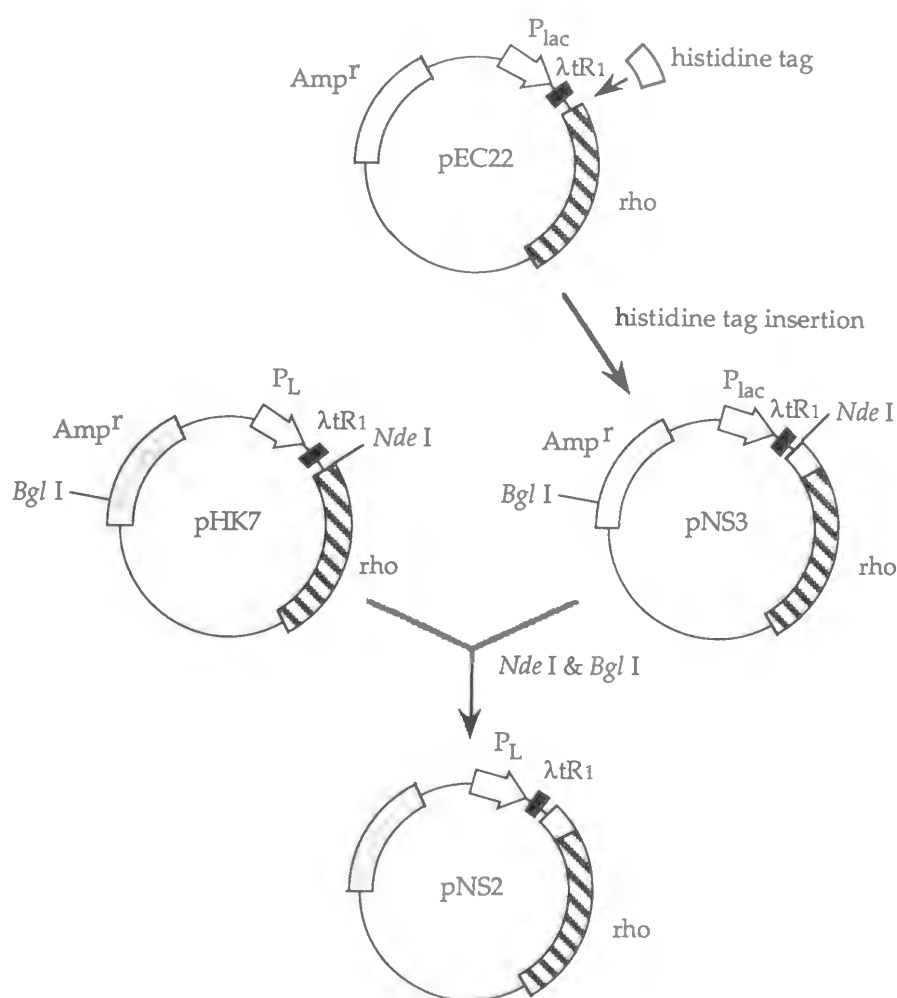


図5 ヒスチジン・タグの付いた rho 蛋白質発現用プラスミドの構築

モーターのかわりに組み込んだプラスミドの作成を試みた。 P_L プロモーターの導入はプラスミド pHK7（鹿児島 修士論文）を利用した。pHK7 は P_L プロモーター、 $\lambda tR1$ ターミネーター、野生型 rho 蛋白質構造遺伝子、 $rmBT1$ ターミネーターをこの順序で持つ。このプラスミドの P_L プロモーターを含む方の $NdeI$ - $BglII$ 断片と pNS3 の rho 蛋白質構造遺伝子を含むほうの $NdeI$ - $BglII$ 断片とを組み換えることによって pNS2 を作成した。一方 pEC22 上にある変異 rho 蛋白質構造遺伝子はこのプラスミド上に 2 箇所ある $AlwNI$ 認識部位とやはり 2 箇所存在する pNS3 上の $AlwNI$ 認識部位とを用いて pNS3

上に移した。またこの種のプラスミド導入や rho 蛋白質の発現が宿主大腸菌に何らかの影響を与える可能性もあることからコントロールとして用いるため pEC22 および pHK7 それぞれから rho 蛋白質をコードする領域を欠失させたプラスミド pEC Δ および pHK Δ をも合わせて作成した。

his-tagged rho 増産の誘導

Plac プロモーターをもつプラスミドは XL1-Blue 株に導入して 37℃で培養し、Klett OD がおよそ 100 になった時点で IPTG を 0.5mM になるように加えて rho 蛋白質の増産誘導を行なった。PL プロモーターをもつプラスミドは HB101 株に導入し、プラスミド pNT203 と共存させて 32℃で培養し、Klett OD がおよそ 100 になった時点で培養温度を 42℃に移すことによって rho 蛋白質の増産誘導を行なった。ここで pNT203 は PL プロモーター、抗転写終結因子 N、温度感受性リプレッサー cI857 をこの順序でもっているプラスミドである。低温においてはこのプラスミドからの N 蛋白質の合成は cI857 によって抑制されているが高温下ではこの抑制が解除されることから N 蛋白質が増産される。したがってこれが pHK7 あるいは pNS2 と共存していると高温下では PL プロモーターのあとにある λ tR1 ターミネーターでの転写終結が N 蛋白質によって抑制されるためその下流にある rho 蛋白質の増産が起こる。

Plac プロモーターをもつプラスミドからの rho 蛋白質の過剰発現を調べてみるとタグのない野生型 rho 蛋白質は若干の過剰発現が観察されたのに対してタグ付き野生型 rho 蛋白質の場合には上述の通り過剰発現はほとんど観察されなかった。一方変異 rho 蛋白質のうち、タグのない場合には Plac プロモーターから過剰発現することが既に確認されているものの場合、タグがある場合でもやはり同レベルに過剰発現することが確認された。

Plac プロモーターからの過剰発現が見られないタグ付き野生型 rho 蛋白質について PL プロモーターからの過剰発現を調べてみるとこの場合は明らかな過剰発現が観察された。ただしタグのない場合に比べてその発現レベルはやや減少した (図6)。

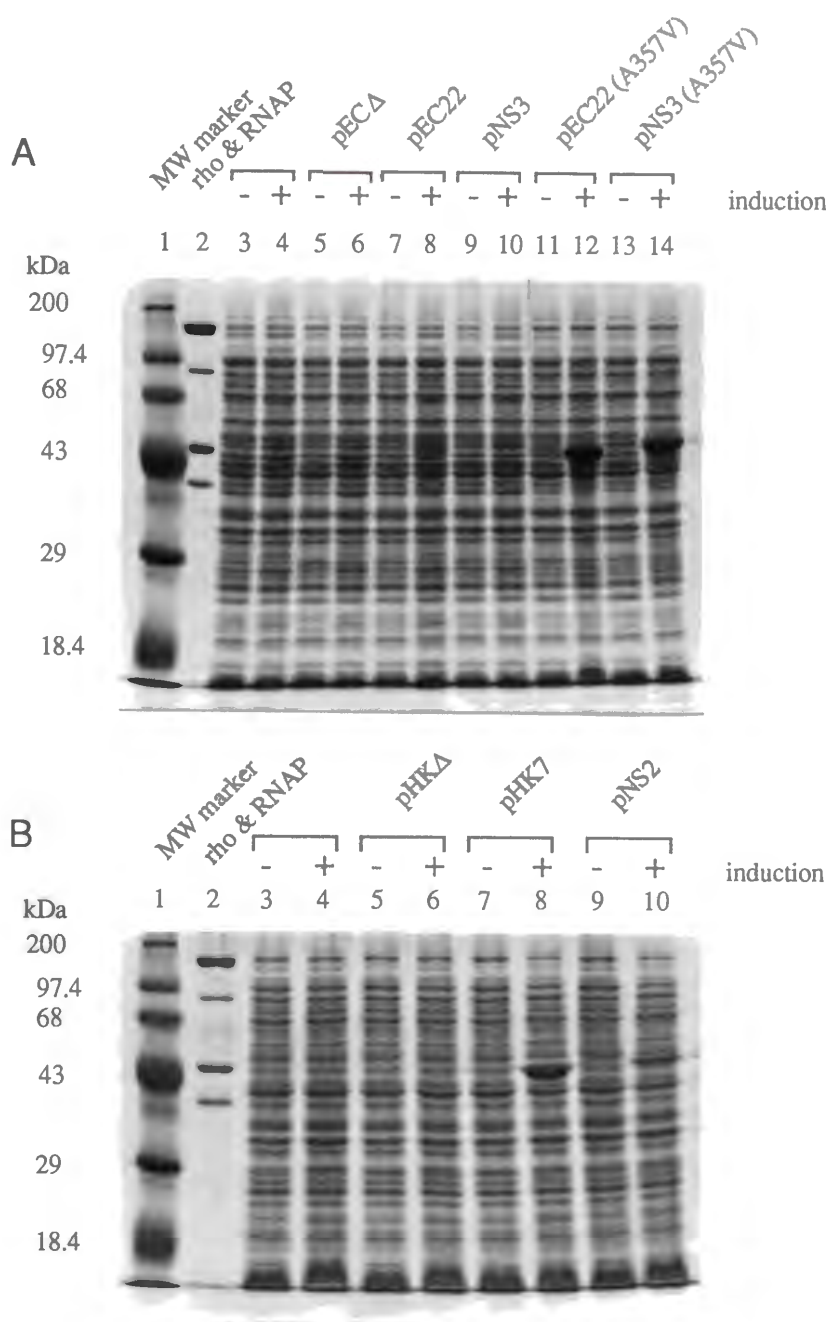


図6 rho 蛋白質の発現誘導

A Plac プロモーターを持つ rho 発現用プラスミドからの発現誘導。レーン 3、4 は rho 発現用プラスミドを入れていないコントロール。菌は XL1-Blue。

B Pl プロモーターを持つ rho 発現用プラスミドからの発現誘導。レーン 3、4 は rho 発現用プラスミドを入れていないコントロール。菌は発現制御用プラスミド pNT203 を含む HB101。

his-tagged rho の精製

ヒスチジン・タグのついた rho 蛋白質はヒスチジンのイミダゾール基の窒素がニッケルに配位結合することを利用し、Ni-NTA agarose カラムを用いて簡便かつ高純度に精製することができる。大腸菌の粗抽出液を直接 Ni-NTA agarose カラムに添加しイミダゾール濃度の段階的勾配によって吸着蛋白質を溶出した。得られた蛋白質にはしかしながら核酸が不純物として多量に含まれていることがその吸収スペクトルから明らかとなった。そこでこのサンプルをさらにヘパリン・セファロースカラムにかけることにした。もしヒスチジン・タグの付いた rho 蛋白質がこれがない rho 蛋白質とほぼ同じコンフォメーションをとっているならこのカラムに吸着するはずである。一方核酸はこのカラムには吸着しない。従って Ni-NTA agarose カラムによって取り除けなかった核酸をこのカラムによって除去することができるものと考えられた。実際 Ni-NTA agarose カラムを通して得られた rho 蛋白質を含む溶出液をヘパリン・セファロースカラムにかけてみるとタグの付いた rho 蛋白質はヘパリンに吸着した。吸着した蛋白質は NaCl 濃度の段階的勾配によって溶出した。この操作の結果、核酸は取り除かれ純度の高い rho 蛋白質標品が得られた。二回目以降の精製では Ni-NTA agarose カラムから溶出するに際してまず初めに 0.5M NaCl を含む buffer で洗浄し核酸を洗い流すようにした (図7)。ただしヘパリン・セファロースカラムの段階は目的蛋白質のさらなる精製と濃縮とを行ないうるため以後の精製でも行なうこととした。

his-tagged rho ATPase 活性の測定

今回作成し精製したヒスチジン・タグの付いた rho 蛋白質がタグのない rho 蛋白質と同等の活性を示すならタグの付いたまま今後の解析に使用することができる。このことには次のような利点がある。ひとつはタグ切除の操作をこの後する必要がないという点である。ヒスチジン・タグのついた rho 蛋白質増産用プラスミドを作成する際、タグを後から切り離せるよう 6 つのヒスチジンの後、rho 蛋白質の前に I-E-G-R を挿入した。この配列はプロテアーゼ Factor Xa によって認識され、このプロテアーゼによっ

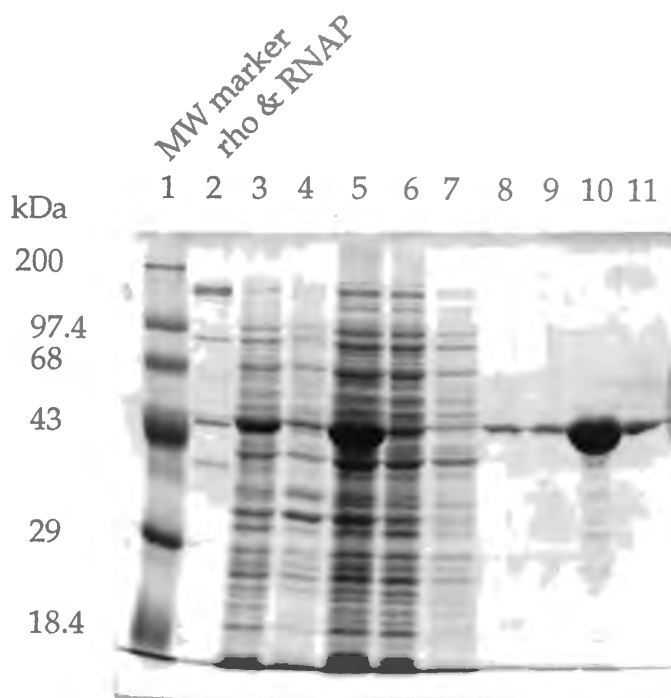


図7 ヒスチジン・タグを導入した rho 蛋白質の精製

細胞破碎後のサンプル（レーン3）、破碎したサンプルを遠心した沈殿（レーン4）、破碎したサンプルを遠心した上清（レーン5）、Ni-NTA カラムに load して得た flow through fraction（レーン6）、0.5M NaCl で wash して得た fraction（レーン7）、40mM imidazole で wash して得た fraction（レーン8）、250mM imidazole で溶出して得た fraction（レーン9～11）。

てアルギニンの直後で切断反応が起こる。これによってタグの付いた rho 蛋白質からタグを切り離すことができる。しかしながら Factor Xa によって、精製した蛋白質からヒスチジン・タグを切り離そうとすれば、その切断反応の後再びヒスチジン・タグ、Factor Xa、タグを切り離された蛋白質の三者を分離する精製操作を行なわねばならず煩雑であるばかりか目的とする蛋白質の収率減少も免れられない。もう一つはヒスチジン・タグを利用した解析が行なえる可能性があるという点である。先に述べたようにヒスチジンとニッケルとの親和性を利用し Ni-NTA agarose カラムにヒスチジン・タ

グの付いた rho 蛋白質を結合させればいわば rho 蛋白質固定化カラムを作成することができ、これを用いることによって rho 蛋白質と他の因子との相互作用を解析できる可能性が考えられた。

そこでヒスチジン・タグの付いた rho 蛋白質がヒスチジン・タグのない rho 蛋白質と同等の活性を示すかどうかについて次に調べた。

rho 蛋白質は RNA の存在下で ATPase 活性を示し、その活性は poly(C) を RNA cofactor とした時最も強く poly(U) を RNA cofactor とすると大幅にその活性は低下するが依然として ATPase 活性は示す (Lowery-Goldhammer and Richardson, 1974, Lowery and Richardson, 1977)。ヒスチジン・タグの付いた野生型および変異型 (E342G, A357V) の rho 蛋白質の ATPase 活性を poly(C), poly(U) の濃度を変化させて測定し、タグのない野生型および変異 rho 蛋白質の場合と比較した (表 2)。その結果タグの付いた野生型および変異型の rho 蛋白質はいずれも ATPase 活性を示し、その活性はタグのない場合と同様に、poly(C) を RNA cofactor としたとき強く poly(U) を RNA cofactor としたときに弱かった。またそれら RNA cofactor の濃度に対する依存性もヒスチジンの有無にかかわらずおおむね似た傾向を示した。さらにもとの rho 蛋白質で見られた野生型と変異型との活性の違いもヒスチジン・タグの付いた rho 蛋白質で同じように観察された。ただし多くの場合 RNA cofactor の濃度が高いとき、タグの付いた rho 蛋白質のほうがタグのない rho 蛋白質より活性が低かった。

このようにヒスチジン・タグの付いた rho 蛋白質はそのままでタグのない rho 蛋白質とほぼ同等の活性を示すことが明らかとなった。そこで以後の解析ではヒスチジン・タグの付いた rho 蛋白質をそのまま使用することにした。

Factor Xa によるヒスチジン・タグの切除

上述の通りタグの付いた rho 蛋白質はそのままでタグのない rho 蛋白質とほぼ同等の活性を示す。しかしながらその活性は完全にはタグのない rho 蛋白質のそれと一致しない。この原因がヒスチジン・タグそのものに由来するのか否かを確認するためタグ

表2 ヒスチジン・タグの有無による ATPase 活性の比較

rho protein	RNA cofactor ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)					
	poly (C)			poly (U)		
	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
wild type	4.0×10^{-1}	15.87	14.28	1.0×10^{-1}	1.06	1.59
wild type (H)	2.08	11.11	10.28	1.3×10^{-1}	3.1×10^{-1}	5.4×10^{-1}
E342G	4.7×10^{-1}	8.77	9.87	0	4.3×10^{-2}	2.9×10^{-2}
E342G (H)	1.92	6.82	8.46	5.2×10^{-2}	7.2×10^{-2}	7.6×10^{-2}
A357V	2.0×10^{-1}	3.17	4.06	3.8×10^{-2}	2.6×10^{-2}	6.6×10^{-2}
A357V (H)	8.2×10^{-1}	1.59	1.55	1.1×10^{-2}	1.6×10^{-2}	1.2×10^{-2}

蛋白質名の後に (H) のあるものはヒスチジン・タグの付いた rho 蛋白質

ATPase 活性の単位 ($\text{nmol}/\mu\text{g}/\text{min}$)

の切除を試みた。タグの付いた rho 蛋白質では 6 つのヒスチジンと rho 蛋白質との間に I-E-G-R の 4 残基があり、プロテアーゼ Factor Xa はこの配列を認識してアルギニンの直後で切断を行なう。50 mM Tris-HCl, pH8.0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ 存在下で Factor Xa を rho 蛋白質に作用させた。初め反応温度を 0℃ に設定したがタグの切除は観察できなかった (図8)。次いで反応温度を 23℃ にしてみたがやはりタグの切除は観察できなかった。このことは Factor Xa の攻撃をうける部分が rho 蛋白質の内部に埋没していることによる可能性もあると考え、タグの付いた rho 蛋白質をあらかじめ熱変性、あるいはアルカリ変性させたうえで Factor Xa と反応させることも試みた。しかしながらこの場合にもやはりタグの切除は観察できなかった。

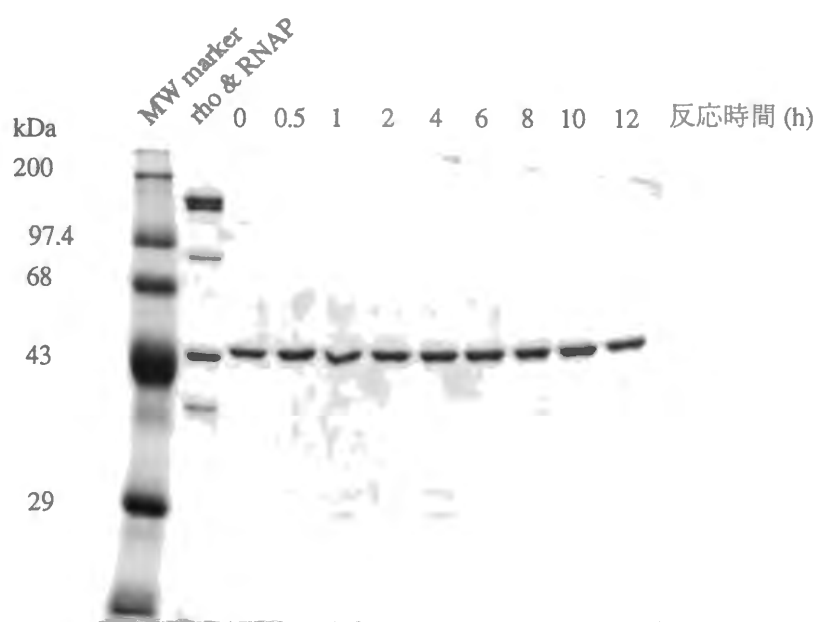


図8 Factor Xa によるヒスチジン・タグの切除実験

最近の研究によれば Factor Xa による切断反応は認識部位の前後の配列によってもかなり左右されることが判ってきている (Matthews and wells, 1993)。今回の発現系では認識配列 (I-E-G-R) をヒスチジン・タグ (H6) と rho 開始コドンの間に直結する形で挿入したが、これが不適切であったのかもしれない。

第二節 NusG 蛋白質と rho 蛋白質との相互作用

NusG 発現用プラスミドの作成

大腸菌の粗抽出液中に存在し λ N 蛋白質による抗転写終結能を促進する因子として Li らによって発見された NusG 蛋白質は (Li *et al.*, 1992)、その後の研究で、rho 依存性転写終結に関与し (Sullivan *et al.*, 1992)、また rho 蛋白質と直接結合すること (Li *et al.*, 1993) が明かとなった。一方、先に三輪らによって同定されていた変異 rho 蛋白質のなかに *in vivo* の解析では転写終結活性を示さないにもかかわらず *in vitro* の解析ではほとんど正常と変わらない転写終結活性を示すものが含まれていた。このことは *in vitro* の実験系には含まれない何らかの因子が *in vivo* では rho 蛋白質に作用している可能性を示唆し、その因子の候補の一つとして NusG が考えられた。このように大腸菌における rho 依存性転写終結機構の全体像を解明するには、rho 蛋白質以外の他の因子の存在を考慮しその因子の転写終結における役割を明らかにすることが必要となってきた。

そこで本研究ではその存在は明らかになっているもののその機能役割について未解明の部分が多い NusG 蛋白質に焦点をあてて研究することにし、そのためにまず NusG 蛋白質増産用プラスミドの作成を行なった。

NusG 蛋白質増産用プラスミドは pAG10 (三輪 未発表データ) を元に作成した (図 9)。pAG10 は pBR322 由来のプラスミドでありアラビノース・プロモーターの下流に SecE 構造遺伝子、NusG 構造遺伝子、PvuII 構造遺伝子の一部がこの順序に配列している。このプラスミドからは NusG 蛋白質の増産のおきないことが確認済みなので、プロモーターをより強力な P_L に組み替えることをまず試みた。pAG10 の NusG 構造遺伝子を含む MluI-PvuII 断片と pHK7 の P_L プロモーターを含む MluI-SmaI 断片とを組み替えることによって pNS4 を作成した。得られた pNS4 から BspEI-MluI 断片を欠失させ

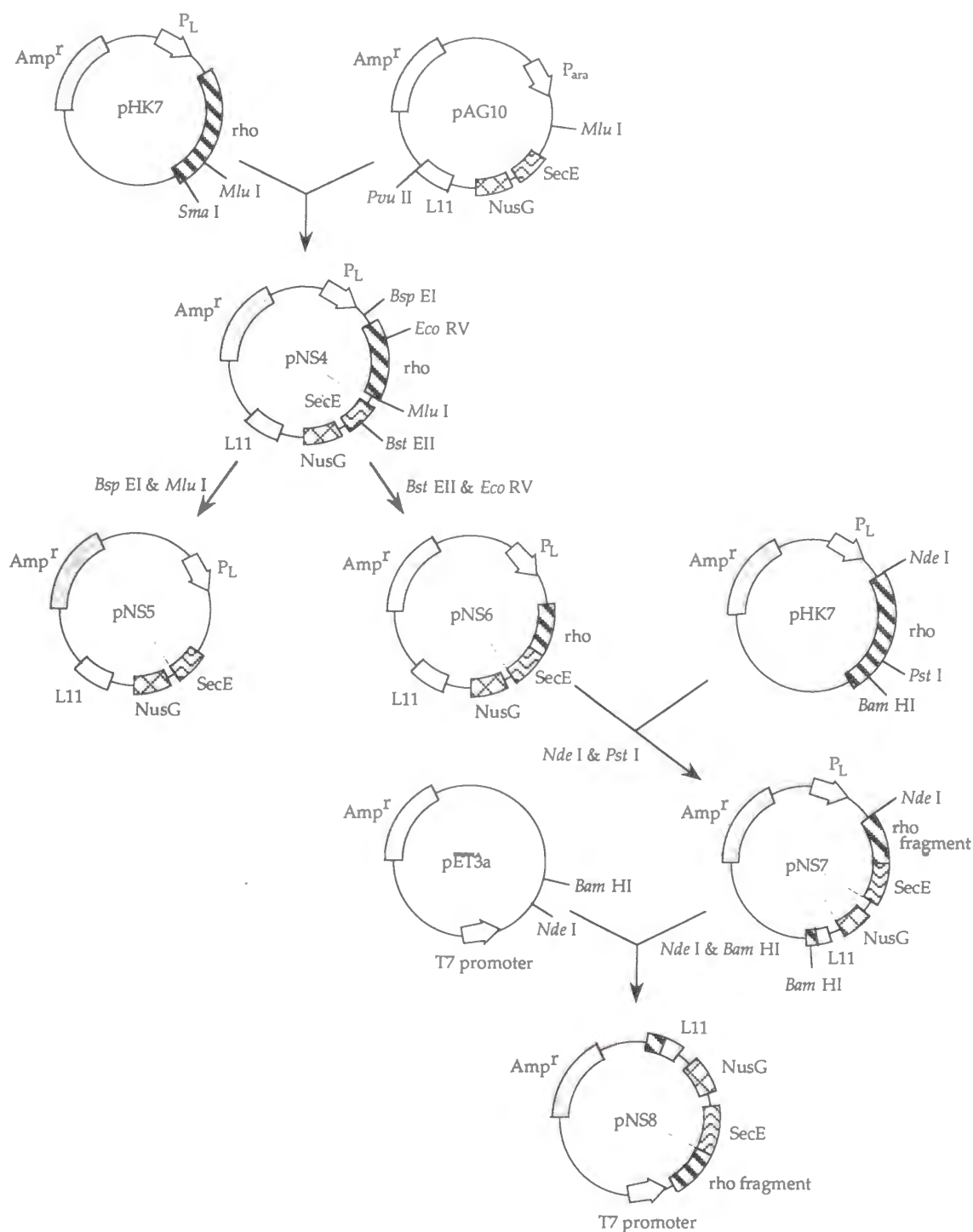


図9 NusG 発現用プラスミドの構築

ることによって pNS5 を *EcoRV*-*BstEII* 断片を欠失させることによって pNS6 を得た。pNS5 は rho 構造遺伝子の SD 配列を pNS6 は SecE 構造遺伝子の SD 配列をそれぞれ利用しようと考えたものである。またいずれのプラスミドにおいても SecE 構造遺伝子の全部または 3' 末の一部を保存した。これは *in vivo* では SecE 構造遺伝子と NusG 構造遺伝子とが翻訳段階で共役している可能性が高いことを考慮したためである。この 2 種のプラスミドを HB101 株に導入し pNT203 共存下で L 培地、terrific 培地の 2 種類の培地において発現誘導を試み、SDS-PAGE によって NusG 蛋白質の増産を調べたが目的の蛋白質の増産は確認できなかった。

そこで PL プロモーターよりさらに強力な T7 プロモーターを PL プロモーターのかわりに組み込むことを試みた。pNS6 の NusG を含む *NdeI*-*PstI* 断片と pHK7 のアンピシリン耐性遺伝子を含む *NdeI*-*PstI* 断片とを組み替え pNS6 に *BamHI* 認識部位を導入した (pNS7)。次いで T7 プロモーターと T7 ターミネーターとを含みマルチクローニングサイトをそれらの間に持つプラスミド pET3a (Studier *et al.*, 1990) の *NdeI*-*BamHI* 断片と pNS7 の NusG 構造遺伝子を含む *NdeI*-*BamHI* 断片とを組み替え pNS8 を得た。

NusG 蛋白質増産の誘導

PL プロモーターを持つ NusG 増産用プラスミド pNS5 および pNS6 は大腸菌 HB101 株に導入し発現制御用プラスミド pNT203 と共存させ L 培地または terrific 培地を用いて 32℃ で培養し Klett OD がおよそ 100 になった時点で培養温度を 42℃ に移して NusG の発現誘導を行なった。大腸菌粗抽出液を SDS-PAGE にかけて調べたところプラスミドの如何、培地の如何にかかわらず目に見える蛋白質の発現誘導は見られなかった。

そこで次に T7 プロモーターを持つ NusG 増産用プラスミド pNS8 を大腸菌 BL21(DE3) 株に導入しそのまま、あるいは T7 lysozyme をコードする遺伝子を持つプラスミド pLysE ないし pLysS を共存させて L 培地または terrific 培地を用いて 37℃ で培養し、Klett OD がおよそ 100 になった時点で IPTG を 0.5 mM になるように加えて NusG の発現誘導を行なった。ここで pLysE あるいは pLysS を共存させたのは pNS8 が

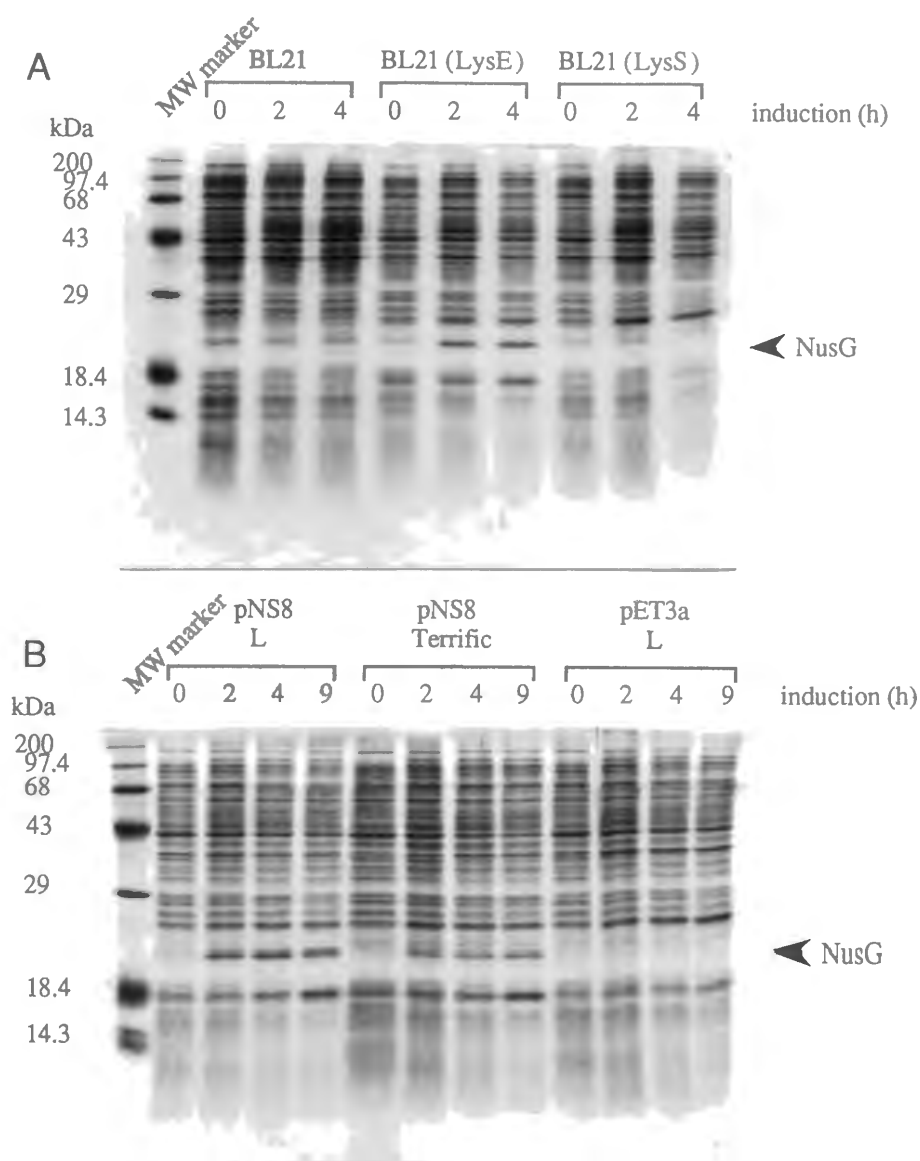


図10 NusG 蛋白質の発現誘導

A BL21 に NusG 発現用プラスミド pNS8 を導入し、pLysE ないし pLysS の有無で NusG の発現の違いを調べた。

B BL21(LysE) に pNS8 を導入し培地の違いによる NusG の発現の違いを調べた。L は L broth を、Terrific は Terrific broth をそれぞれ表す。

コードしている遺伝子産物が宿主菌にとって有害である場合基底レベルの T7 RNA polymerase の活性のみで宿主菌に害をおよぼす可能性があるため、それを低下させることを目的に T7 RNA polymerase の阻害剤である T7 lysozyme を宿主菌に供給するためである。なお pLysE と pLysS とでは蓄積する lysozyme の量に違いがあり pLysE の方が pLysS よりもその量が多い。またこれら lysozyme を供給するプラスミドを宿主菌に共存させることには、菌体内に lysozyme が蓄積することから実際に目的とする蛋白質の精製のために溶菌を行なう際あらたに外から lysozyme を加える必要がないという利点もある。発現誘導を行ないその大腸菌の粗抽出液を SDS-PAGE にかけてみると pLysE を持つ BL21(DE3) 株でのみ発現誘導のかかった蛋白質が存在し、その泳動度から分子量を推定すると約 21 kDa であった。このことからその蛋白質は NusG であると判断された。またその発現レベルはほぼ 4 時間で極限に達した。さらに terrific 培地の場合より L 培地の方が NusG の発現誘導のレベルが高かった (図10)。

NusG 蛋白質の精製

NusG 蛋白質は既にその精製法が確立されているが (Li *et al.*, 1992) その方法は非常に煩雑なので本研究ではより簡単な精製法の確立をめざした。NusG のアミノ酸配列よりその等電点を推定すると 6.41 であり中性付近では Q-Sepharose カラムにほとんど吸着しないと予想された。したがって大腸菌の粗抽出液を中性付近で Q-Sepharose カラムに添加しカラムに吸着せずに流れ出てくる液を回収することにより NusG のある程度の精製が行なえるものと考えられた。IPTG の添加により NusG の発現誘導を十分行なった菌体を超音波処理により溶菌しこれに DNaseI 処理と PolymyxinP 処理とを施して核酸を除去した。これに 50% 硫酸沈殿処理を行ない得られた NusG を含む画分を脱塩後 Q-Sepharose カラムに添加して 50 mM から 287.5 mM の KCl の直線濃度勾配で吸着蛋白質を溶出した (図11)。実際にはこの条件下では NusG 蛋白質は Q-Sepharose カラムに弱く吸着し 0 mM から 100 mM KCl で溶出された。NusG を含む画分にはまだそれ以外の蛋白質も含まれていたためさらに精製を進めるためヘパリンカラムを使用した。

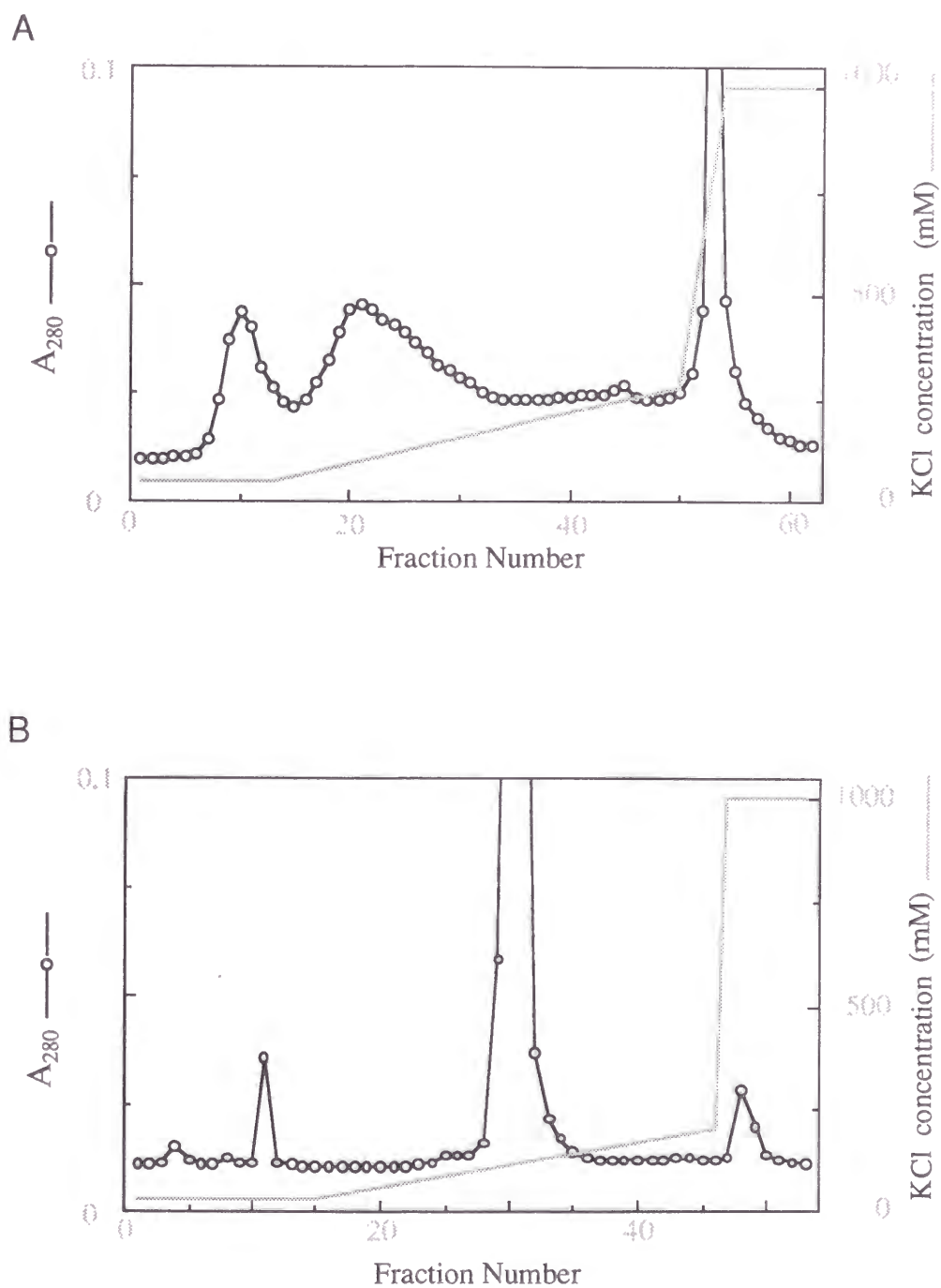


図11 NusG 蛋白質の精製過程
 A Q-Sepharose カラムクロマトグラフィー
 B ヘパリンカラムクロマトグラフィー

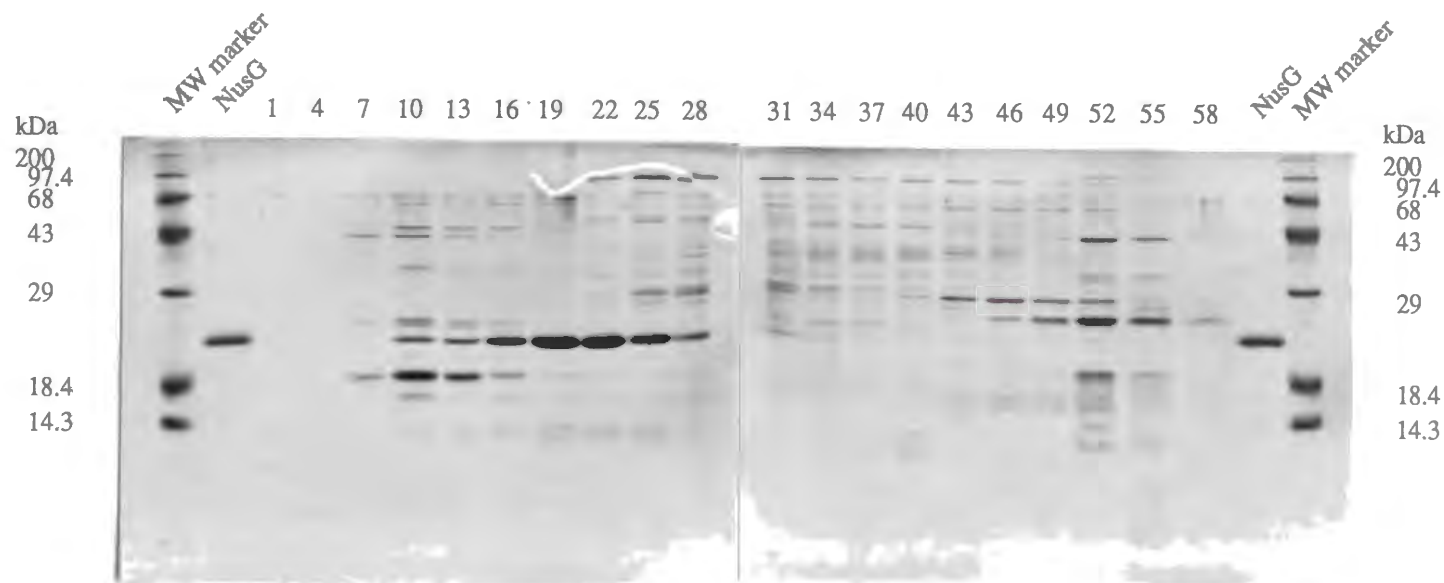


図12 Q-Sepharose による NusG 蛋白質の精製
数字は fraction number

NusG はヘパリンカラムには吸着する。Q-Sepharose カラムを通し、透析により KCl を除いた NusG を含む溶液をヘパリンカラムに添加し吸着蛋白質を 25 mM から 200 mM の KCl の直線濃度勾配で溶出したところ NusG は 100 mM から 150 mM KCl で溶出された (図12)。NusG を含む画分を集めて SDS-PAGE によって調べたところその純度はおよそ 97% であった。

NusG 共存下での rho *in vitro* 転写終結活性の測定

NusG 蛋白質は rho 蛋白質と直接相互作用し、特に高塩濃度で rho 依存性転写終結部位での転写終結効率を上昇させる。また複数の rho 依存性転写終結部位が連なっている場合に、NusG 蛋白質が存在すると、そうでないときに比べて転写終結がより上流において起こるようになる (Li *et al.*, 1993)。このように NusG 蛋白質が rho 依存性転写終結において重要な役割を果たしているのは明らかだが、より具体的に NusG 蛋白質が rho 依存性転写終結にどのような関わりかたをしているのかについては不明である。先に三輪らは PCR 法を利用して rho 蛋白質の C 末領域にランダムに変異を導入した。得られた変異 rho 蛋白質のうちの 14 種類については特に解析が進んでいる (表3)。これらは *in vivo*, *in vitro* のいずれでも転写終結能の低下したもの (グループI、II、III)、*in vivo*, *in vitro* のいずれでも転写終結能が上昇したもの (グループIV)、*in vivo* では転写終結能が低下しているが *in vitro* では野生型と同等の転写終結能を有するもの (グループV) の 3 グループに大きく分けられる。このうち最初のグループに属する変異 rho 蛋白質はさらに ATP 結合能の低下したもの (グループI)、ATP 結合能は正常だが ATP 加水分解能が低下したもの (グループII)、poly(C) を RNA cofactor としたときには野生型の約半分の ATP 加水分解活性を示すもの (グループIII) の 3 グループに分けられる。これら様々な性質を示す変異 rho 蛋白質と NusG 蛋白質とを組み合わせることでより NusG 蛋白質が rho 依存性転写終結において果たす役割についての何らかの知見が得られるものと期待された。そこでまず λ pR プロモーターとその下流に λ tR1 ターミネーターとが配置されている DNA 断片を鋳型として *in vitro* で NusG 蛋白質と rho 蛋白質

表3 C 末領域変異 rho 蛋白質の性質

Group	rho protein	growth (+IPTG)	transcription termination		ATPase activity (% of control)		K_d for ATP (μM)	ATPase λcroRNA (% of control)	K_a for croRNA ($K_a \times 10^{-8} \text{M}^{-1}$)	主な性質
			<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	poly (C)	poly (U)				
	wild type	+	+	+	100	7.8	2.0	100	9.1	
I	K326E	-	-	-	0.4		25	<0.1	5.6	
	D328G	-	-	-	15		16	13.4	3.0	転写終結能低下
	K336E	-	-	-	6.7		11	3.5	2.6	ATP 結合能低下
	A357V	-	-	-	12		25	9.9	5.3	加水分解能低下
	R366H	-	-	-	0.7		7.0	<0.1	9.5	
II	L320P	±	-	-	12		1.9	2.7	1.6	転写終結能低下
	E333D	-	-	-	15		1.6	7.7	6.3	ATP 結合能正常 加水分解能低下
III	M327T	-	-	-	34		1.6	5.6	5.3	転写終結能低下
	M341V	±	-	-	45		1.5	5.1	<1.0	poly (C) によって 野生型の 1/2 の
	E342G	-	-	++	42		2.0	12.9	<1.0	ATP 加水分解活性
IV	E329G	±	++	++	50	16	1.7	82.2	11.7	転写終結能上昇
	H344R	±	++	++	42	35	2.3	91.8	9.4	poly (U) での ATP
	E392K	±	++	++	56	10	1.1	27.9	11.1	加水分解能上昇
V	M416K	±	-	+	38		3.1	49.3	1.7	

質とを共存させて RNA polymerase に転写をおこなわせ、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP の取り込みによってラベルされた産物 RNA をポリアクリルアミド尿素ゲルに展開した後オートラジオグラムにより解析し、NusG が存在しない条件下の場合と比較してみた (図13)。

1) 野生型

まず野生型の rho 蛋白質の場合をみると NusG が存在しない場合には使用した鋳型 DNA において従来報告されていた 5 つの部位で rho 依存性転写終結が観察されたのに対し (Tsurushita *et al.*, 1989) NusG が存在する場合にはその 5 つの終結部位に加えてさらに少なくとも 2 箇所でも rho 依存性転写終結が観察された。これらの終結部位はその電気泳動での泳動度から推定して従来 rut 部位と呼ばれている、rho 因子が転写を止める際に最初に結合すると考えられている部位に相当する (以後この部位を *trutA*、*trutB* と呼ぶ)。また全体として転写終結の頻度分布が NusG の存在しない場合に比べて鋳型 DNA のより上流側に移行するで傾向を示していた。これらの結果は以前の報告と良く一致する。

2) グループI,II および III

次に変異型 rho 蛋白質について見てみると、グループI とグループII では NusG の有無にかかわらず rho 依存性転写終結部位での転写終結は全く観察できなかった。一方グループIII では NusG が存在しない場合には転写終結がほとんど起こらないが、NusG が存在すると λ tR1 ターミネーター中に存在する 5 つの rho 依存性転写終結部位 (部位 1,2,3,4,5) のうち M327V では部位2,3,4,5 特に部位2,3 で、M341V では部位2,3,4 で、E342G では部位2,3 でそれぞれ弱いながら転写終結が検出できるようになった。

3) グループIV

3 種類のグループIV に属する変異型 rho 蛋白質ではいずれの場合も λ tR1 部位で野生型と同等以上の転写終結能を示す。このうち E329G はさらに上流域の *trutA*、*trutB* でも NusG なしで転写終結を引き起こすことが分かった。NusG を加えると鋳型 DNA のさらに上流での転写終結が強まり、*trutA*、*trutB* より長い産物はほとんど検出されなくなった。H344R でも λ tR1 ターミネーターの部位 1,2,3,4,5 のいずれでも転写終結がお

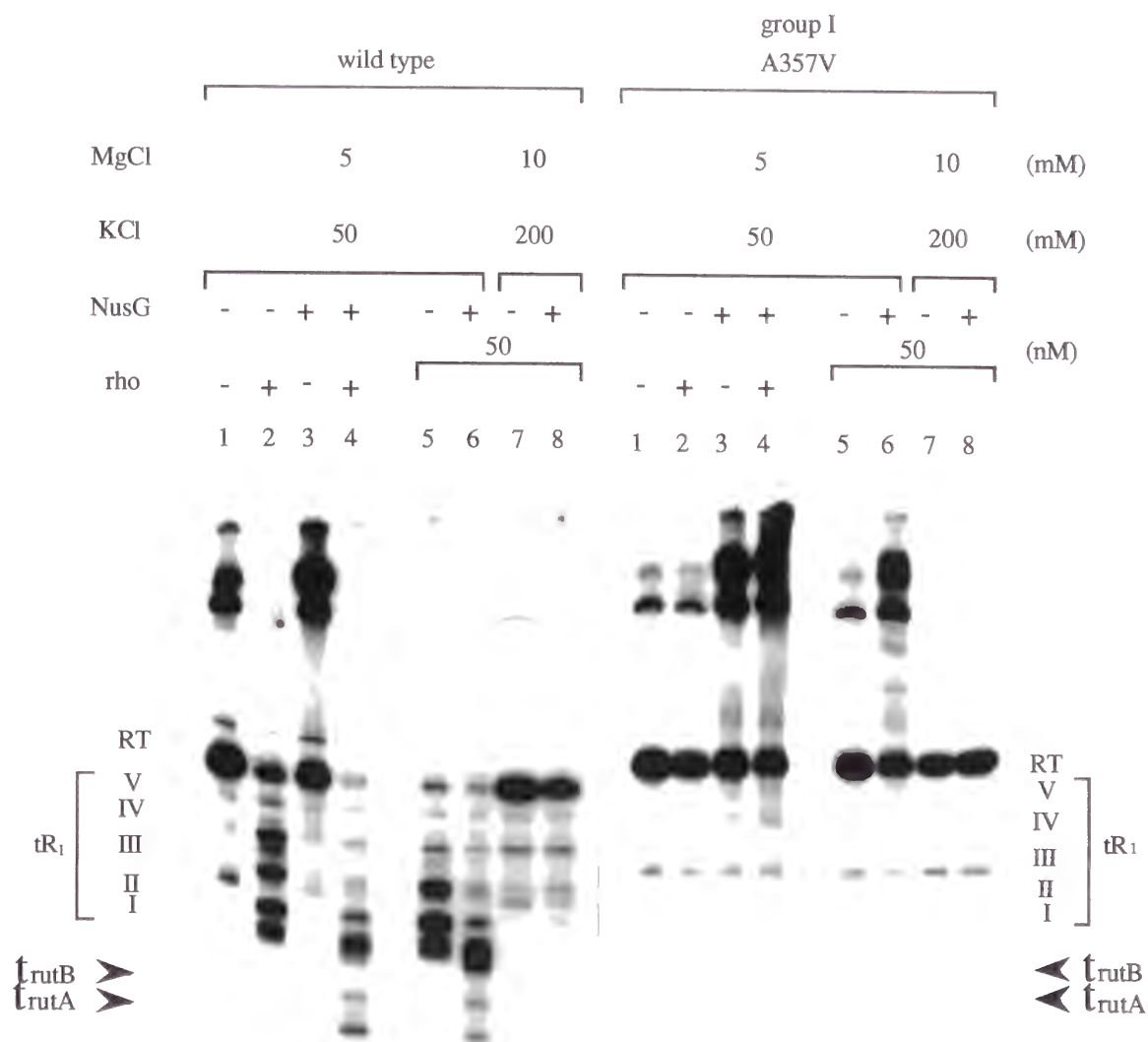


図13-1 *in vitro* RNA 合成

I、II、III、IV、V は既知の rho 依存性転写終結部位、RT は read through を表す。
レーン2、4：330nM rho；レーン5、6、7、8：50nM rho
レーン3、4：710nM NusG；レーン6、8：500nM NusG

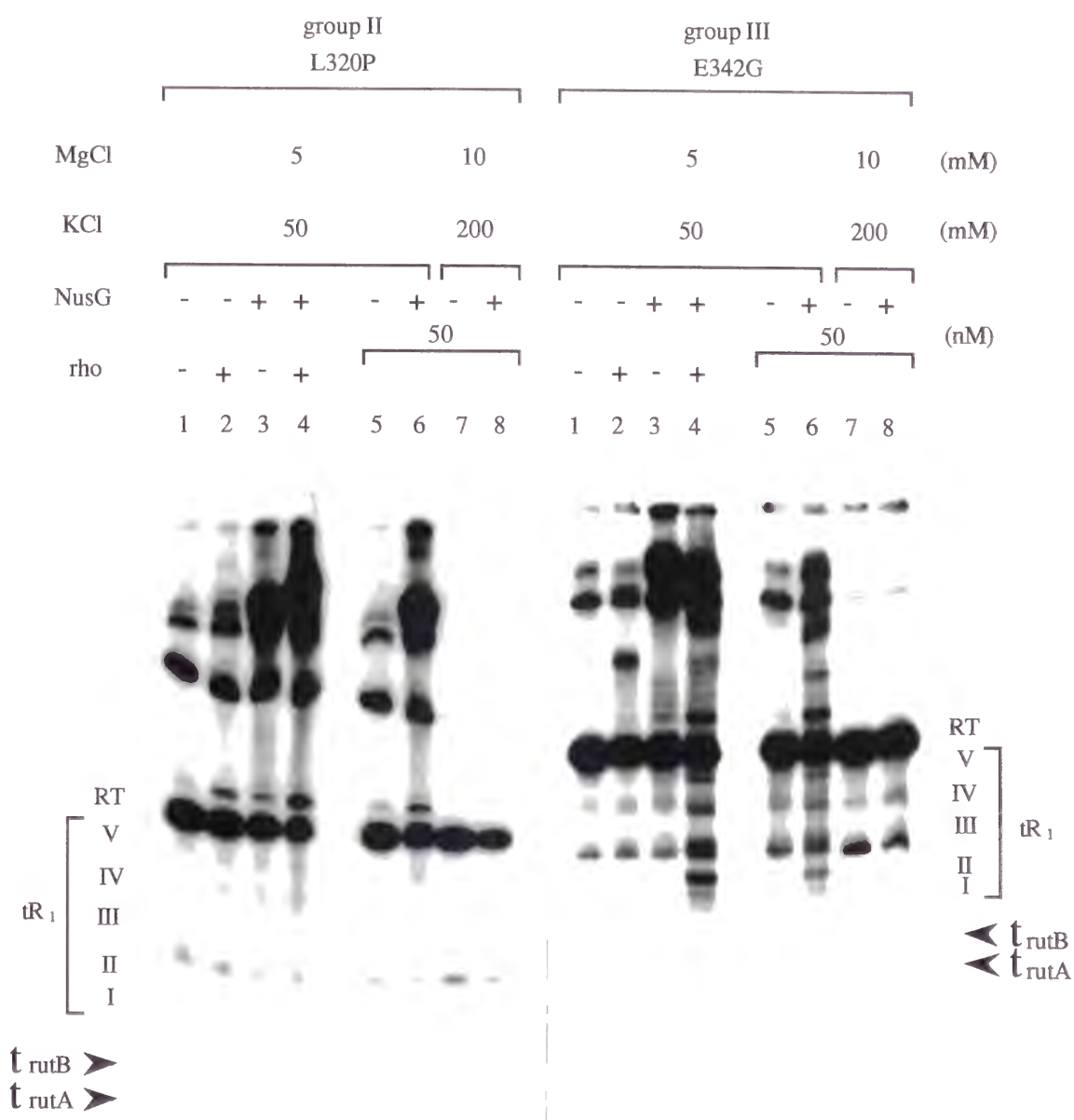


図13-2 *in vitro* RNA 合成

I、II、III、IV、V は既知の rho 依存性転写終結部位、RT は read through を表す。

レーン2、4：330nM rho；レーン5、6、7、8：50nM rho

レーン3、4：710nM NusG；レーン6、8：500nM NusG

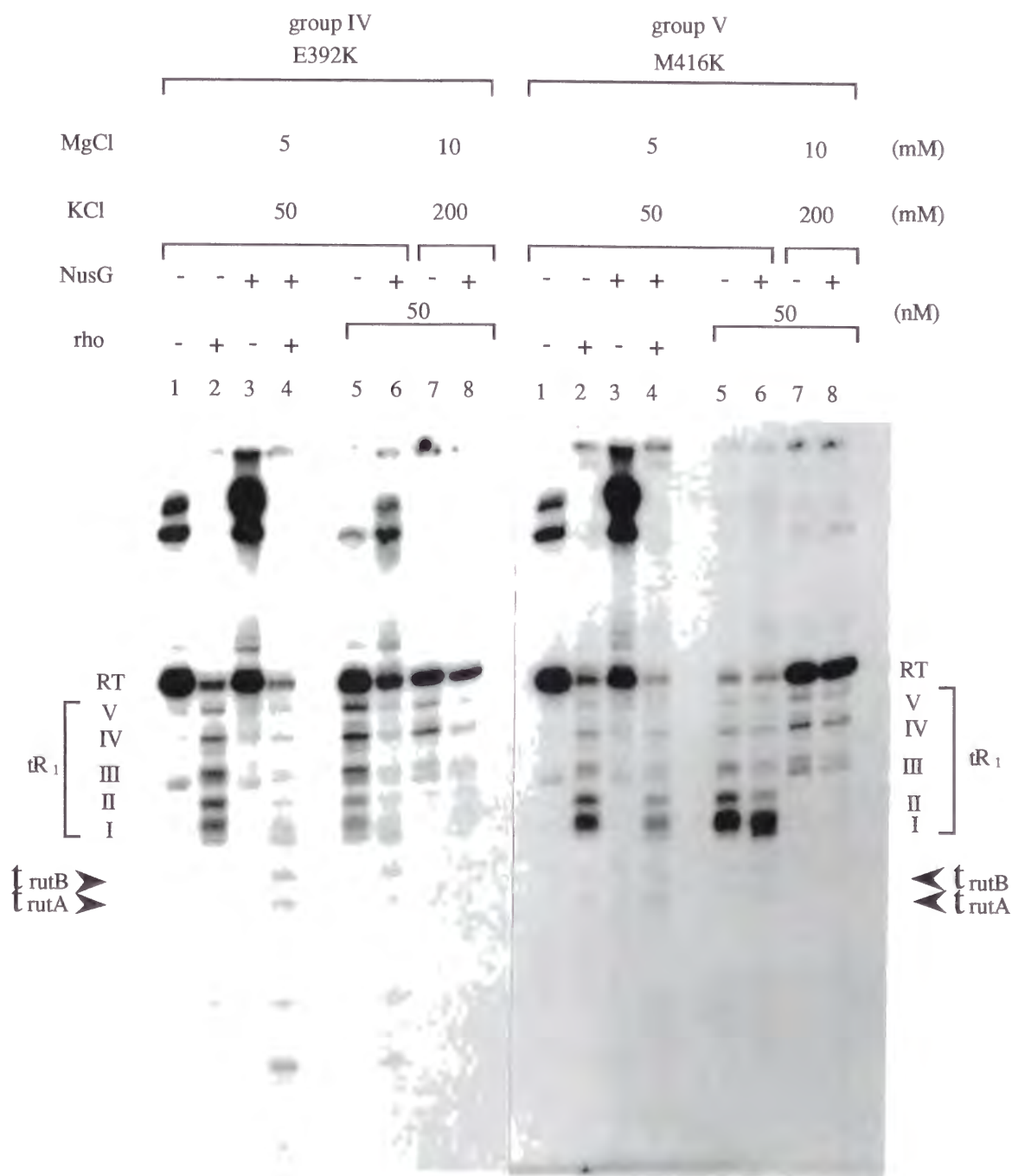


図13-3 *in vitro* RNA 合成

I、II、III、IV、V は既知の rho 依存性転写終結部位、RT は read through を表す。

レーン2、4：330nM rho；レーン5、6、7、8：50nM rho

レーン3、4：710nM NusG；レーン6、8：500nM NusG

きていたが特に部位 1 でのそれが顕著であり部位 4 や部位 5 での終結はかなり少なかった。またこの場合にもやはり NusG なしに *rutA*、*rutB* での転写終結が起こっていた。一方 NusG が存在すると λ tR1 ターミネーターより上流の部位での転写終結が強く起こる傾向を示し、*rutA*、*rutB* よりさらに短い産物（約 200 base）も検出された。E392K では E329G に近いパターンを示した。このうち特に部位 5 での転写終結の割合が野生型に比べて増大していた。NusG が存在するとやはり λ tR1 ターミネーターより上流の部位での転写終結が強く起こる傾向を示した。

4) グループV

グループVに属する変異 rho 蛋白質 M416K の場合、NusG が存在しないとき λ tR1 ターミネーターの 5 箇所の rho 依存性転写終結部位で転写の終結が観察されたが、そのうちの部位 1 および部位 2 で特に強く終結が起こっていたのに対し部位 4 や部位 5 での転写終結産物は野生型に比べて少なく転写終結が鋳型 DNA のより上流で起こる傾向がある。しかしながらグループIVの3種の変異 rho 蛋白質の場合にみられたような λ tR1 ターミネーターよりさらに上流での転写終結は観察されなかった。また NusG が存在する条件下では野生型の場合にそうであったように λ tR1 ターミネーターより上流の *rut* 部位での終結が観察されたが終結の程度は小さく、大部分は λ tR1 ターミネーターの 5 箇所の終結部位、特に部位 1 で起こっていた。

NusG と rho とのクロスリンク

NusG と rho とが相互作用するという報告がある。それは NusG を固定化したカラムに大腸菌の粗抽出液を流したところ、カラムに rho 蛋白質がひっかかったことによる。しかしながらこの実験では NusG をカラムに固定化しているので、溶液中とは条件が異なる可能性が考えられる。そこで溶液中でも確かに両者が会合していることを確かめる為に両者の間でクロスリンクも架けてみた（図14）。ゼロ長架橋剤である EDC を用いて、NusG のみ、rho のみ、およびこの両者を共存させた場合の三種類の条件下で架橋反応を行ってみると、rho のみの場合にも多くのバンドが得られたが、rho と NusG

とを共存させた場合にのみ出現するバンドが観察された。このバンドはその移動度から判断して rho と NusG との間にクロスリンクが架かったものと考えられる。この結果はカラムによる実験と同様、溶液中で rho と NusG とが明らかに会合し得ることを示していると考えられる。

以上の結果を大きくまとめると、大部分の変異体は NusG に対する感受性を保持しており、mutation は別の作用点に関係するものと思われる。唯一 M416K は感受性を失っており、NusG の作用メカニズムを追求する上で興味深い材料になると思われる。

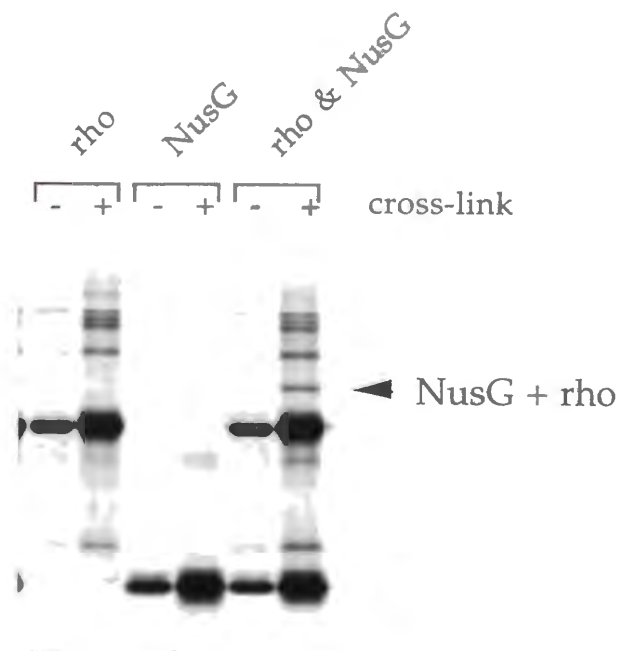


図14 NusG と rho との EDC によるクロスリンク

第三節 化学修飾法による rho 蛋白質の高次構造解析

六量体の取りうるシンメトリー

既に述べたように、rho 蛋白質は条件によって様々な会合状態をとりうるが、生理的な条件に近い特定の条件下では六量体を形成する (Geiselman *et al.*, 1992a)。

この六量体は平面上に六つのプロトマーがリング状に配置したものであるが、このような配置をとるとき各プロトマーのとりうる向きにはどのような可能性が考えられるであろうか。

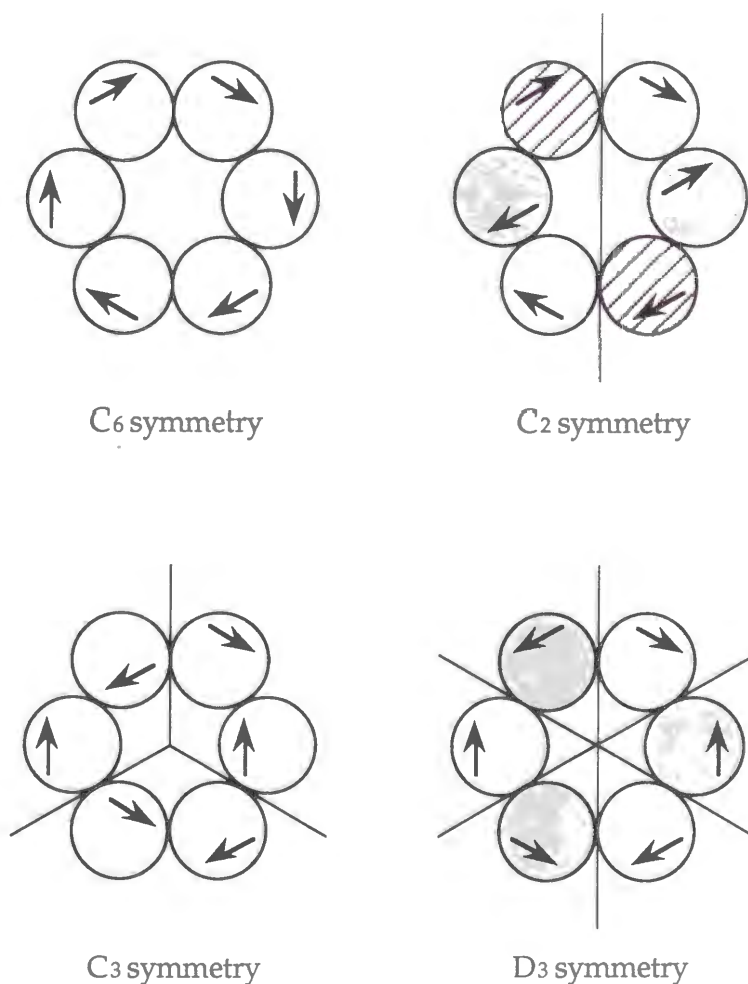


図15 リング状の六量体を取りうるシンメトリー

安定な六量体を構成する全てのプロトマーが同じ一次構造を持つ以上、各プロトマーの配向には規則性があるはずである。今考えているような、リング状の六量体の場合、あり得るプロトマーの配向は以下の四種類であると考えられる。すなわち C_2 、 C_3 、 C_6 および D_3 シンメトリーである (図15)。

C_2 シンメトリーは六量体の中心を通る二回軸を持ち、三つの異なるプロトマー間接触面を持つ。asymmetric unit は三量体である。 C_3 シンメトリーは六量体の中心を通る三回軸を持ち、二つの異なるプロトマー間接触面を持つ。asymmetric unit は二量体である。 C_6 シンメトリーは六量体の中心を通る六回軸を持ち、プロトマー間接触面は一種類である。asymmetric unit は単量体である。 D_3 シンメトリーは六量体の中心を通る三回軸を持ち、さらにそれと直交する三本の二回軸を持つ。二つの異なるプロトマー間接触面を持ち、asymmetric unit は二量体である。

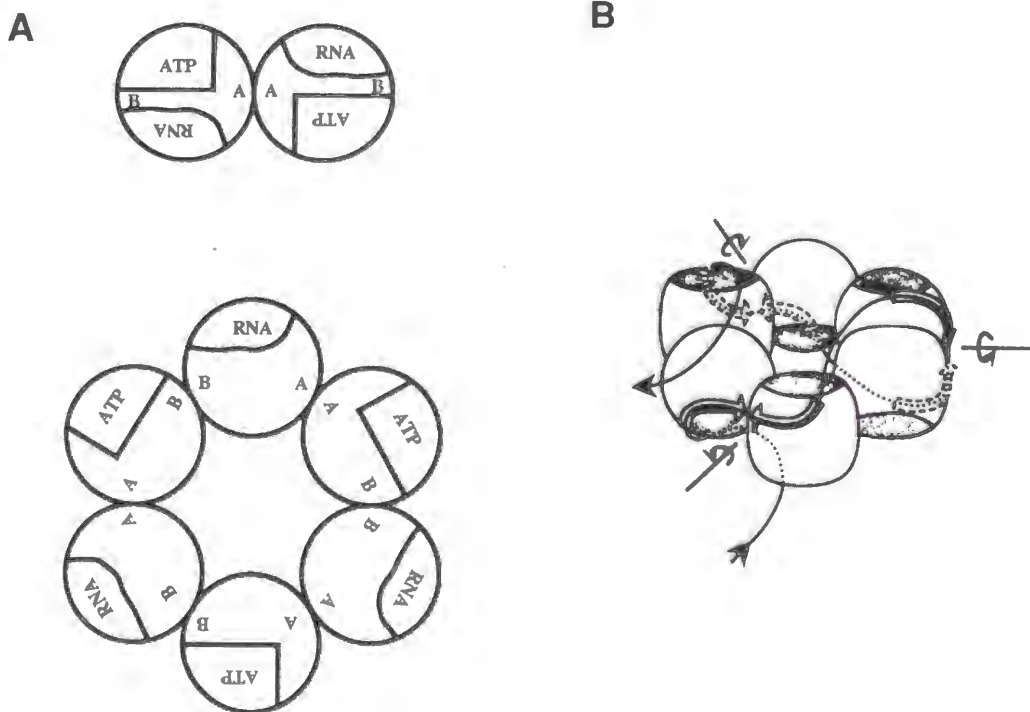


図16 Geiselman 等によるrho 六量体の高次構造モデル

A rho 六量体の D_3 シンメトリーモデル

B rho 蛋白質六量体と RNA との相互作用モデル

rho 蛋白質は従来、主にクロスリンク実験の結果より、D₃ シンメトリーをとると考えられてきた。そしてそのシンメトリーを基にした RNA との相互作用モデルも提唱されている (Geiselman *et al.*, 1993; 図16)。

ところが、このシンメトリー・モデルでは上手く説明できないことがその後いくつか明らかとなってきた。まず、かねてより rho との間に アミノ酸配列上の相同性が指摘されていた F₁-ATPase の結晶構造が明らかにされた (Abrahams *et al.*, 1994)。F₁-ATPase はミトコンドリアの内膜上にあってプロトンの輸送に伴って、ADP より ATP を合成する酵素であり、三種類のサブユニット $\alpha\beta\gamma$ からなる ($\alpha_3\beta_3\gamma$)。このうち rho と相同性のあるサブユニットは α と β であり、その程度は26%の identity、58%の similarity である (図17)。この値はあまり高いものとは言えないかもしれない。しかしながら、 α サブユニットと β サブユニット間の相同性も同程度である。にもかかわらず両サブユニットの三次構造は驚くほど酷似している。しかも α および β サブユニット間で保存されている領域と rho とこれらのサブユニットの間で保存されている領域は極めて似ている。そしてこの α および β サブユニットは三つずつ交互にリング状の六量体を形成する。そのシンメトリーは大局的に見れば C₃ シンメトリーあるいは偽 C₆ シンメトリーとでも呼ぶべきものであり、D₃ シンメトリーでは全くない。そうであるなら rho が F₁-ATPase の α あるいは β サブユニットと類似する高次構造をとる可能性が十分に考えられる。

特に ATP 結合部位に着目して見た場合、その可能性はより強くなる。結晶解析より明らかにされた F₁-ATPase の ATP 結合部位近傍のアミノ酸残基はそのほとんどが rho 蛋白質でも保存されているからである (図18)。しかも注目すべきことは β サブユニットの ATP 結合に隣の α サブユニットのアルギニン残基が関与している。そしてこのアルギニン残基が rho でも保存されているのである。もし rho が F₁-ATPase と同様の ATP 結合をするのであれば、このアルギニン残基がそれに関与している可能性が高いがそのためには rho は D₃ シンメトリーではなく C₆ シンメトリーを取る必要がある。

ATP アナログを rho と反応させその結合部位を調べてみると、それはまさに F₁-

<i>E.coli</i> p	1	M	N	L	T	E	L	K	N	T	P	V	S	E	L	I	T	L	G	E	N	M	G	L	E	N	L	A	R	M	R	K	Q	D	I	I	F	A	I	L	K	Q	H	A	K	S	G	E	D	I	F	G	D	G	V	L	E	I	L	Q	D			
ATPase α	1	-	Q	K	T	G	-	T	A	E	V	S	S	I	L	E	E	R	I	L	G	A	D	T	S	V	D	L	E	E	T	G	R	V	L	S	I	G	D	G	I	A	R	V	H	G	L	R	N	V	Q	-	-	A	E	E	M	V	E	F	S			
ATPase β	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	P	S	P	K	A	G	A	T	T	G	R	I	V	A	V	I	G	A	V	V	D	V	Q	F	D	E	-	G	L	P	P	I	L	N	A	L	E	V	Q
<i>E.coli</i> p	61	G	F	G	F	L	R	S	A	D	S	S	Y	L	A	G	P	D	D	I	Y	V	S	P	S	Q	I	R	R	F	N	L	E	T	G	D	T	I	S	G	K	I	R	F	P	K	E	G	E	R	Y	F	A	L	L	K	V	N	E	N	-			
ATPase α	57	S	G	L	K	G	M	S	L	N	L	E	P	-	-	D	N	V	G	V	V	F	G	N	D	-	-	-	K	L	I	K	E	G	D	I	V	K	R	T	G	A	I	V	D	V	P	V	G	E	E	L	L	G	E	V	D	A	-					
ATPase β	40	G	R	E	T	R	L	V	L	E	V	A	Q	H	L	G	E	S	T	V	R	T	I	A	M	D	G	T	E	G	L	V	E	-	G	Q	K	V	L	D	S	G	A	P	I	R	I	P	V	G	P	E	T	L	G	R	I	M	N	-				
<i>E.coli</i> p	121	F	D	K	P	E	N	A	R	N	K	I	L	F	E	N	L	T	P	L	H	A	N	S	R	L	R	M	E	F	G	N	G	S	T	E	D	L	T	-	A	R	V	L	D	L	A	S	P	I	G	R	G	O	F	G	L	I	V	A	P			
ATPase α	111	L	G	N	A	I	D	G	K	G	P	I	G	S	K	A	R	R	R	V	G	L	K	A	I	G	I	P	R	I	S	V	R	E	P	M	Q	T	G	I	K	A	V	D	S	L	V	P	I	G	R	G	O	F	E	L	I	I	N	D				
ATPase β	98	I	G	E	P	I	D	E	R	G	P	I	K	T	K	Q	F	A	A	I	H	A	E	A	P	E	F	V	E	M	S	V	E	Q	E	L	L	V	T	G	D	K	V	V	D	L	L	A	P	Y	A	K	G	G	K	I	G	L	F	G				
<i>E.coli</i> p	180	P	K	A	G	K	T	M	L	L	Q	N	I	A	Q	S	I	A	Y	N	H	P	-	-	-	-	-	D	C	V	L	M	V	L	L	I	D	E	R	P	E	E	V	T	E	M	Q	R	L	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
ATPase α	171	R	Q	T	G	K	T	S	I	A	I	D	T	I	I	N	Q	K	R	F	N	D	G	T	D	E	K	K	K	L	Y	C	I	Y	V	A	I	G	Q	K	R	S	T	Y	A	Q	L	V	K	R	L	T	D	A	D	-	-	-	-	-				
ATPase β	158	A	G	V	G	K	T	V	F	I	M	E	L	I	N	N	V	A	K	A	H	G	-	-	-	-	-	-	G	Y	S	V	F	A	G	V	G	E	R	T	R	E	G	N	D	L	Y	H	E	M	I	E	S	G	V	I	N	L	K	D				
<i>E.coli</i> p	224	-	-	-	K	G	E	V	V	A	S	T	F	D	E	P	A	S	R	H	V	Q	V	A	E	M	V	I	E	K	A	K	R	L	V	E	H	K	-	K	D	V	I	I	L	L	D	S	I	T	R	L	A	R	A	Y	N	T	N	V	P			
ATPase α	225	A	M	K	Y	T	I	V	V	S	A	T	A	S	D	A	A	P	L	Q	Y	L	A	P	Y	S	G	C	S	M	G	E	Y	F	R	D	N	G	-	K	H	A	L	I	I	Y	D	D	L	S	K	Q	A	V	A	Y	R	Q	M	S	L			
ATPase β	211	A	T	S	K	V	A	L	V	Y	G	Q	M	N	Q	P	E	G	A	R	A	R	V	A	L	T	G	L	T	V	A	E	Y	F	R	D	Q	E	G	Q	D	V	L	L	F	I	D	N	I	F	R	F	T	Q	A	T	S	E	V	S	A			
<i>E.coli</i> p	280	A	S	G	K	V	L	T	G	-	G	V	D	A	N	A	L	H	R	P	K	R	F	F	G	-	A	A	R	N	V	E	E	-	-	G	G	S	L	T	I	I	A	T	A	L	I	D	T	G	S	K	M	D	E	V	I	Y	E	E	F			
ATPase α	284	L	L	R	R	P	E	G	R	E	A	Y	P	G	D	V	F	Y	L	H	S	R	L	L	E	R	A	A	K	M	N	D	A	F	G	G	G	S	L	T	A	L	P	V	I	E	T	Q	A	G	D	V	S	A	Y	I	F	T	N	V	I			
ATPase β	271	L	L	G	R	I	E	S	A	V	G	Y	Q	P	T	L	A	T	N	M	G	T	M	Q	E	R	I	-	T	T	T	K	-	-	-	K	G	S	-	I	T	S	V	Q	A	I	Y	V	P	A	D	D	L	T	D	P	A	F	A	V	T	E		
<i>E.coli</i> p	336	K	G	T	G	N	M	E	L	H	L	S	R	K	I	A	E	K	R	V	F	P	A	I	D	Y	N	R	S	G	T	R	K	E	E	L	L	T	T	-	Q	E	E	L	Q	K	M	W	I	L	R	K	I	I	H	P	-	-	-	-				
ATPase α	344	S	I	T	-	D	G	Q	I	F	L	E	T	E	L	F	Y	K	G	I	R	P	A	I	N	V	G	L	S	V	S	R	V	G	S	A	A	Q	T	-	R	A	M	K	Q	V	A	G	T	M	K	L	E	L	A	Q	Y	R	E	V	A			
ATPase β	327	A	H	L	-	D	A	T	T	V	L	S	R	A	I	A	E	L	G	I	Y	P	A	V	D	P	L	D	S	T	S	R	I	M	N	P	N	I	V	G	S	E	H	Y	D	V	A	R	G	V	Q	K	I	L	Q	D	Y	K	S	L	Q			
<i>E.coli</i> p	390	-	-	-	-	-	-	M	G	E	I	D	A	M	E	F	L	I	N	K	L	A	M	T	K	T	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
ATPase α	402	A	F	A	Q	F	G	-	-	S	D	L	D	A	A	T	Q	Q	L	L	S	R	G	V	R	L	T	E	L	L	K	Q	G	Q	Y	S	P	M	A	I	E	E	Q	V	A	V	I	Y	A	G	V	R	G	Y	L	D	K	L	E	F	P			
ATPase β	386	D	I	I	A	I	L	G	M	D	E	L	S	E	E	D	K	L	T	V	S	R	A	R	K	I	Q	R	F	L	S	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図17 F1-ATPase と rho との sequence alignment

ATPase の ATP 結合部位と同様の位置であった (Dombroski *et al.*, 1988)。このことは rho と F1-ATPase とで保存されている部位でやはり rho も ATP 結合を行っている可能性を示唆するものである。

そこでさらに、これまでに蓄積されている rho の変異体を F1-ATPase の構造上にプロットしてその変異の性質と構造との間に関係があるかどうか調べてみた。その結果、ATP 結合能に変異の見られる変異体 (KE336、DG328、KE326、AV357、FS355、RH366) は全て ATP 近傍に落ちることが分かった (Miwa *et al.*, 1995)。

以上のような理由で rho 蛋白質六量体は D₃ シンメトリーではなく C₆ シンメトリーをとる可能性が考えられた。仮にそうであるとすれば、これまで考えられてきた RNA との相互作用モデルも考え直す必要があり、rho の転写終結への関わり方の枠組みも再検討の必要性が出てくる。

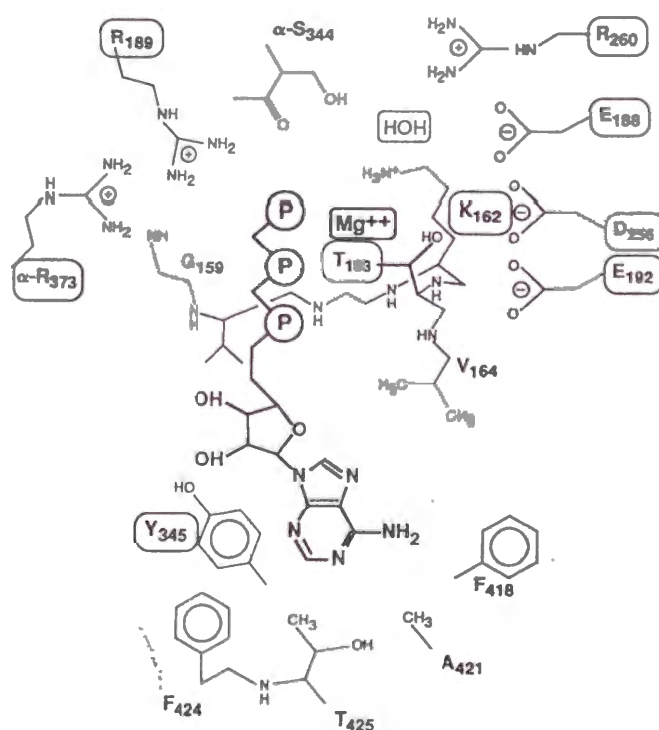


図18 F1-ATPase β サブユニットにおける ATP 近傍の構造 rho 蛋白質で保存されているアミノ酸残基を四角で囲んで示した。

それでは、どうすれば rho 六量体のシンメトリーを知ることができるであろうか。

Hajdu *et al.* (1976) によればオリゴマー蛋白質のシンメトリーは複数の架橋剤によるクロスリンクのバンドパターンと架橋産物の時間変化によって判別可能である。これに対して Geiselman *et al.* (1992) の実験は一種類の架橋剤による、ある特定の反応時間による架橋産物の電気泳動パターンを主要な根拠にしている点、この実験解釈には十分再検討の余地があるものと考えられた。

そこで、Hajdu *et al.* の方法を応用することで、rho 六量体においても、架橋部位が二種類存在する場合に、この蛋白質がとるシンメトリーの違いを弁別しうるか検討した。その結果、以下に述べるように、二種類の架橋の反応速度が異なるならば、そのバンドパターンおよび架橋された二量体および三量体の量比、さらに架橋された二量体の比率の時間変化を総合すればシンメトリーを区別できることが分かった（表4 および補遺参照）。

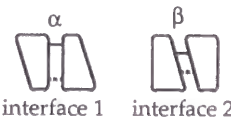

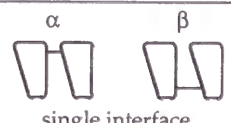
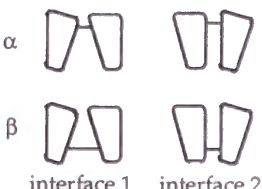
DMS による rho 蛋白質のクロスリンク

架橋反応を詳細に解析することで rho 六量体のシンメトリー情報を得ることができる。

そこで、まず初めに rho に DMS を用いてクロスリンクをかけてみた。Geiselman *et al.* とほぼ同じ条件で rho にクロスリンクをかけ、TCA 沈殿を行った後、Laemmli の系で二量体領域が十分拡大されて見えるゲル濃度（5%）で電気泳動し、僅かな架橋産物も十分検出できるよう銀染色を試みた。

ところが、架橋反応を行わなかった場合でも二量体領域にバンドが観察され、さらに架橋反応を行った場合には、さらに多くのバンドが得られた。すくなくとも架橋反応なしの条件下では単量体以外のバンドが出るのはおかしいので、電気泳動にかけるサンプルの条件検討を行った。その結果、 β -mercapto ethanol を通常より過剰に投入する必要があること、さらに TCA 沈殿を行わない方が良いことが分かった（図19）。はっきりした原因は不明であるが、 β -mercapto ethanol を過剰に入れることでバンドを消失

表4 クロスリンクによって生じる二量体と三量体の挙動を指標にしたリング状六量体を取る様々なシンメトリー間の相違

Symmetry	Dimer		Trimer	
	subspecies ^a	ratio of subspecies ^b	subspecies ^c	ratio of subspecies ^b
D3	 interface 1 interface 2	variable with time	$\alpha\beta$ $\alpha\beta$ $\alpha\beta$ $\alpha\beta$	equivalent
C3	 interface 1 interface 2	variable with time	$\alpha\beta$ $\beta\alpha$	equivalent
C6	 single interface	constant	$\alpha\alpha$ $\alpha\beta$ $\beta\alpha$ $\beta\beta$	variable with kinetic parameters
C3/6	 interface 1 interface 2	variable with time	$\alpha\alpha$ $\alpha\beta$ $\beta\alpha$ $\beta\beta$	variable with kinetic parameters

a 各シンメトリー間のトポロジーの違いとクロスリンク (α, β) の違いを示した。
D3 シンメトリーの場合、理論的には各接触面に二本の架橋が生じうるが（実線と破線とで示した）、実際にはそのうちのどちらか一方しかかかっていないと考えられる（本文参照）。

b 本文と補遺参照

c 期待される三量体の種類をクロスリンクの種類 α, β の組み合わせで示した。
D3 シンメトリーの場合一つの接触面の異なる架橋を下線の有無で区別した。

β -mercaptoethanol	-	+	-	-	-	-
acetone precipitation	-	-	+	-	-	+
ethanolamine	+	+	+	-	+	+
NaOH	+	+	+	+	-	+
TCA precipitation	+	+	+	+	+	-

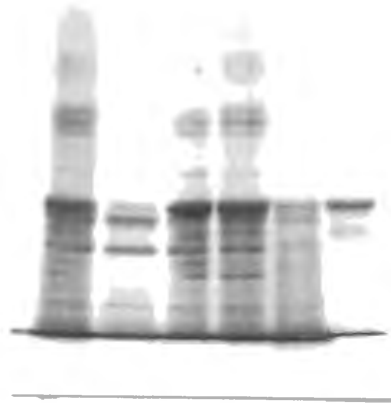


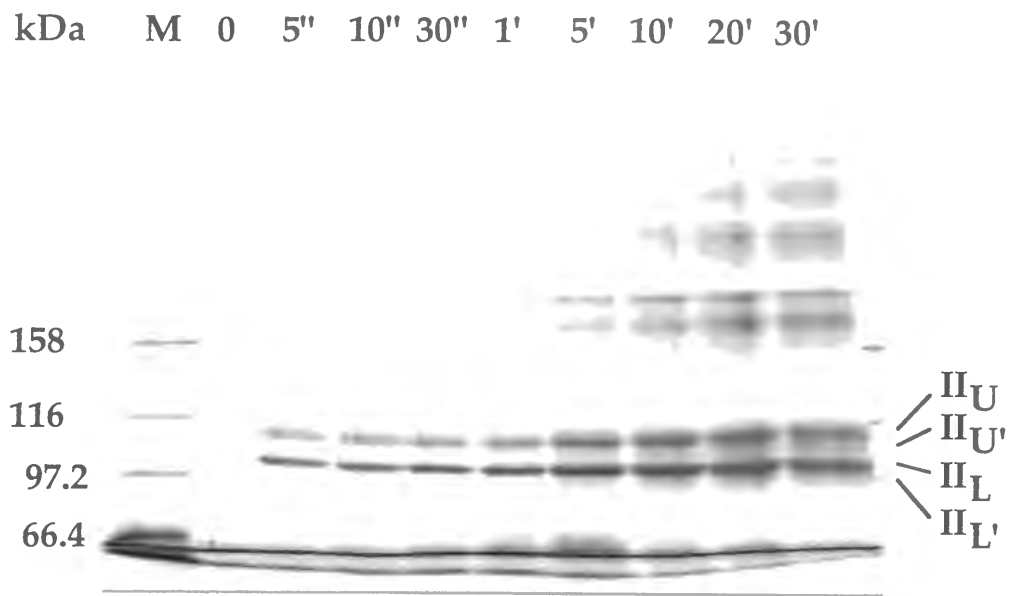
図19 架橋産物を電気泳動する際の条件検討

架橋剤を除いた様々な条件で rho 蛋白質を処理してから泳動したもの。全て単量体であるから、バンドはダイ・フロントにのみでることが期待されたが、実際には複数のバンドが観察された。検討した条件：1) 架橋反応後のサンプル調製に β -mercaptoethanol を使用するか否か、2) 架橋反応後のサンプル調製に acetone 沈殿を行うか否か、3) 架橋反応を停止するのに ethanolamine を使用するか否か、4) 架橋反応後のサンプル調製に NaOH による pH 調整を行うか否か、5) 架橋反応後のサンプル調製に TCA 沈殿を行うか否か。

させることができたことから高濃度で rho 蛋白質を保存していたことによる、ジスルフィド結合の生成の可能性が考えられる。

このため、架橋反応後、TCA 沈殿はせず、 β -mercapto ethanol を過剰に加えたサンプルバッファーを用いて電気泳動を行った（図20）。すると単量体はダイフロントと共に流れ、架橋された二量体から六量体と考えられる分子量の何本かのバンドが出現した。このうち二量体領域には確かに二本の同じ位の強さのバンドが観察された。また、反応時間を長くしても新たな追加のバンドは検出されなかった。

A



B

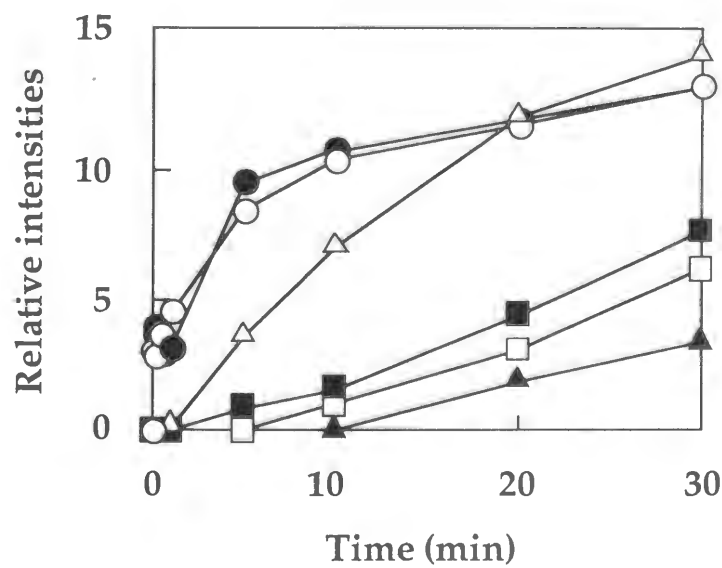


図20 架橋剤 DMS による rho 蛋白質の架橋
 A DMS による架橋産物量の時間変化。II_{U'}、II_{L'} はminor な架橋産物 (本文参照)。
 B DMS による架橋産物量の時間変化のプロット。●, II_L; ○, II_U; △, II_{L'}; ■, IV;
 □, V; ▲, VI.

異なる緩衝液系をもちいた電気泳動

これら二本の二量体領域のバンド (IIu、IIl) はいずれも架橋された二量体であると Geiselman 等は報告している。しかしながら、最初、両者が同じ分子量であるとしては、あまりにも移動度に違いがありすぎるように思われた。試みに10%のゲルに同じサンプルをながしてみたところ、分子量92K Da 程の分子同士であれば、分離ゲル上端からの移動距離の差はより縮まるはずであるのに、ゲル濃度5%の場合とほとんど差がなかった (図21)。このことはさらに IIu は二量体ではなく三量体である可能性を示唆するかのよう思われた。

そこでさらにその可能性について検証するため、Laemmli の系で電気泳動して得られた二本のダイマーバンドをゲルから切り出して、electroelution により回収し、より分子量を忠実に反映して泳動される Weber-Osborn の系の4%の濃度のゲルで、それぞれ別々のレーンに電気泳動をしてみた。すると両者の移動度にはほとんど差がみられなかった (図21)。このことは両者の荷電がほぼ同じであることを示しているものと考えられる。また Laemmli の系においても両者の移動度には差が見られるものの、大きくは一つのクラスターを成して泳動されることから、Geiselman *et al.* と同様に両者はともに二量体であると結論した。但し Weber-Osborn の系でもゲルの濃度を10%と高くしてみると両者の移動度には明らかな差が見いだされた。したがって、高濃度のゲル中での電気泳動における移動度に差はゲルを流れるときの抵抗のかかり方が大きく異なるために起きる現象であると考えられる。

それでは両者の移動度の違いは何に起因するのか？単に架橋部位の違いによるのか、それとも一方は一回、他方は二回クロスリンクが架かっていることによるのか。

両者とも一回ずつクロスリンクが架かったものとするのは最も単純である。この場合、架橋部位の違いが電気泳動における移動度の違いに反映していると考えることが出来る。

これに対して二本の二量体バンドのうち一方は一回、他方は二回クロスリンクが架かったものであるとすると、以下の二点に対して合理的な説明を与えることができない

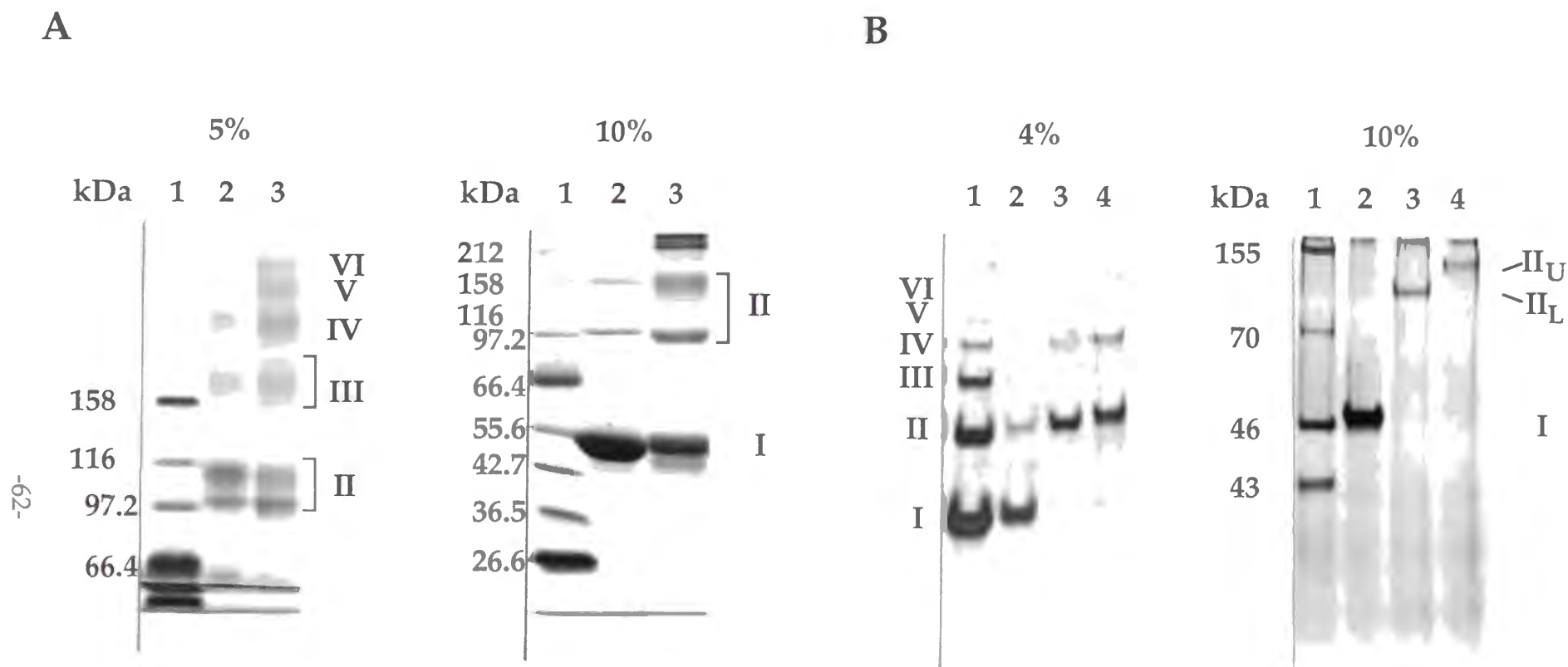


図21 異なる泳動条件での架橋産物の挙動

A 異なる濃度のゲルを用いた Laemmli の系での電気泳動。双方ともレーン1：分子量マーカー、レーン2：DMS による架橋反応1分、レーン3：DMS による架橋反応10分。単量体から架橋された六量体までを、それぞれI、II、III、IV、Vで示してある。

B 異なる濃度のゲルを用いた Weber & Osborn の系での電気泳動。左のパネル レーン1：架橋されたトータルの rho 蛋白質、レーン2：架橋していない単量体、レーン3：架橋して Laemmli の系で分離した II_L をelectro elution によって回収したサンプル、レーン4：同様にして得た II_U。右のパネル レーン1：RNAPolymerase と rho、レーン2～4：左のパネルと同様。

い。

一つは、二つの架橋された二量体のバンドはほぼ同時に出現しているということである。二回のクロスリンクが架かるためには、まず一回目のクロスリンクが起こらなければならない。つまり二回クロスリンクの産物は一回クロスリンクの産物より常に遅れて生じなければならない。そしてそれは架橋三量体の出現と時を同じくするはずである。しかしながら実際は、二種類の二量体は三量体の出現より早く、ほぼ同じタイミングで出現している。

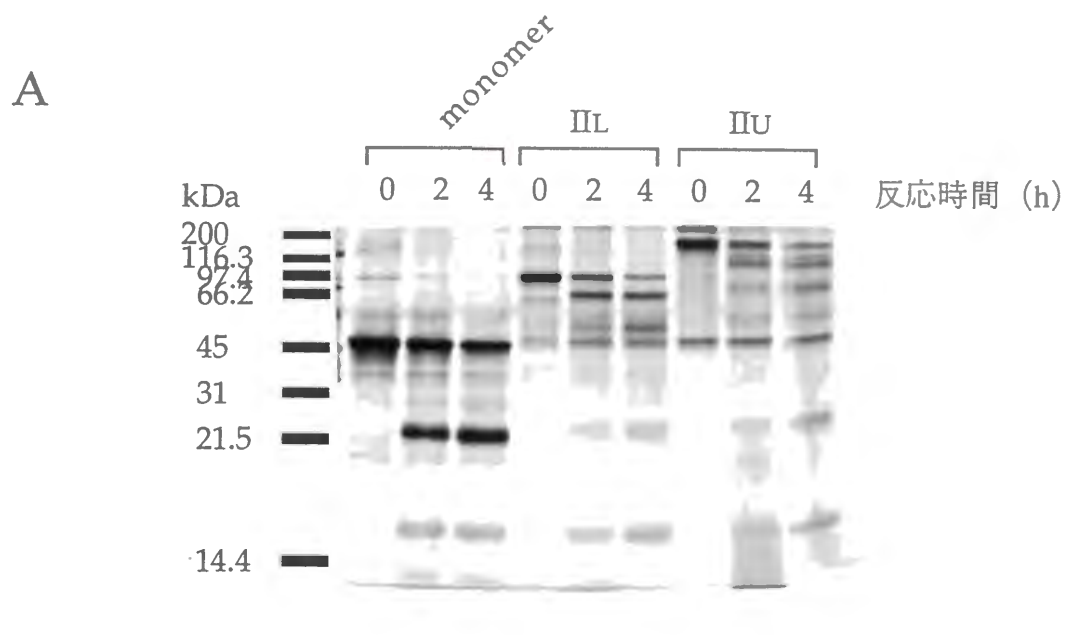
もう一つは、二種類の二量体のバンドの強さの強弱が逆転する架橋剤が存在するということである。後で述べるように、複数の異なる架橋剤を用いて ρ に架橋をかけてみたところ、二量体の強さに強弱が観察され、しかもその強弱は架橋剤によって全く逆転することがある。ここで二種類の二量体のうち一方が一回だけクロスリンクが架かったものであり、もう一方が二回クロスリンクが架かったものであるとする。このとき、もし、二量体の種類が架橋の回数に依存するのであれば、どの架橋剤を使っても一回クロスリンクの二量体が多く出現するか、少なく出現するかのいずれかのはずであり、架橋剤の種類によって強くなったり弱くなったりすることはあり得ない。

さらに後述する DMA でクロスリンクを架けた際には、三量体のバンドが観察されるのと時期を同じくして主要な二つの二量体バンドのそれぞれ下にマイナーなバンドが観察された (図23)。それらのバンドの正体は確かめていないので明らかではないが、これこそが二重に架橋が架かった産物である可能性も考えられる。

以上のような理由で、観察された主要な二本の二量体バンドはいずれも一度だけ架橋の架かった産物であると考えられる。

Hydroxylamine による切断実験

二量体バンドの SDS-PAGE における移動度の違いが架橋の回数ではなく、架橋部位の違いに依存するのであるとするなら、それらは具体的にどのように違うのであろう



B

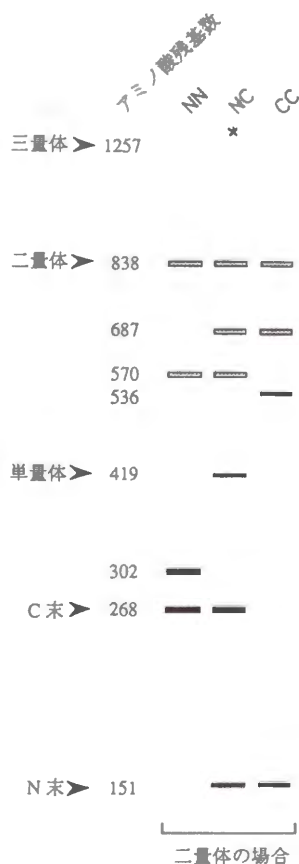


図22 架橋した rho 蛋白質の hydroxylamine による切断

A I、IIL、IIU をそれぞれ hydroxylamine で切断し電気泳動した

B 予想される切断パターン。黒く塗りつぶしたバンドは完全に切断された場合に出現するバンド。薄く塗りつぶしたバンドは二量体のどちらか一方のみが切断されたときに生じるバンド

か。

このことを調べる一つの手掛かりとして架橋された二量体の切断実験を行ってみた。hydroxylamine はアスパラギン-グリシンという配列を認識して、これら二つのアミノ酸残基の間で切断反応を起こす。rho 蛋白質にはこの配列が一カ所しかない (N151-G152)。したがって rho 蛋白質に hydroxylamine を作用させれば rho は二つのフラグメントになる。クロスリンクの架かった rho 蛋白質二量体に hydroxylamine を作用させた後 SDS-PAGE を行ってそのバンドパターンを解析すれば、切断部位に対して N 末同士でクロスリンクが架かっているのか C 末同士で架かっているのか、それとも N 末と C 末とでクロスリンクが架かっているのかを知ることができる。そこで Laemmli の系を用いて架橋した rho 蛋白質を電気泳動し、得られた二種類の架橋された二量体をゲルから切り出し、次いで electroelution によってそれぞれ別々に回収して、それぞれを hydroxylamine 処理した後、再び Laemmli の系で電気泳動して得られたバンドパターンを比較した (図22)。

得られたバンドパターンから分かったことは、二種類の二量体のいずれを hydroxylamine 処理した場合も、およそ151アミノ酸残基および263アミノ酸残基と考えられるフラグメントを生成するということである。このことはクロスリンクがいずれの場合も N151-G152 に対して N 末と C 末とで架かっていることを意味する。したがってクロスリンクによって得られる二種類の二量体の電気泳動上の移動度の違いは同じようにこの N 末と C 末とでクロスリンクが架かりながら、その位置が異なることに拠るものと考えた。

様々な架橋剤によるクロスリンク

二種類の架橋部位が存在するとすれば、それぞれ架橋されるリジン残基対間の距離に差がある可能性がある。DMS より架橋長の短いクロスリンク剤を用いればどちらか一方だけしかクロスリンクが架からない場合があるかもしれない。もし D3 シンメトリ

一をとるなら二種類ある架橋のうち一方が起こらなければ三量体以上は出現しないことになる。他方 C6 シンメトリーならどちらか一方だけしかクロスリンクが架からない場合でも三量体以上は出現する。また仮にクロスリンクがいずれの架橋部位でも架かったとしても、その反応速度に違いがでる可能性が考えられる。もしそういう場合があれば理論的に予測されるようにシンメトリーの違いを判別することができる。そこで我々は DMS より架橋長の短い imidoester 類の架橋剤を用いて rho にクロスリンクを試みた (表5、図23)。

DMP と DMA を用いると DMS と同様に rho にクロスリンクを架けることができた。このうち DMP によって生じたバンドパターンは DMS によるものとほとんど違いがなかった。DMS と同じくらいの早さで反応が進行し、同程度の強さの架橋二量体バンドが二本観察され、さらに反応時間が進むにつれ六量体までのバンドが出現した。

一方 DMA によって生じるバンドパターンは、DMS によるものとの間に大きな違いが見られた。架橋された二量体は DMS の場合と同様に二種類観察され、六量体までのバンドも観察されたが、二種類ある二量体バンドのうち移動度の小さい方のバンド

表5 本研究に使用した架橋剤

Cross-linker	Reaction group	Spacer arm length (Å)
Dimethylsuberimidate (DMS)	imidoester	11
Dimethylpimelimidate (DMP)		9.2
Dimethyladipimidate (DMA)		8.6
Bis[2-(sulfosuccinimidoxycarbonyloxy)ethyl]sulfone (sulfo-BSOCOES)	N-hydroxysuccinimide ester	13
Disuccinimidyl suberate (DSS)		11.4
Disuccinimidyl glutarate (DSG)		7.7
Disulfosuccinimidyl tartarate (sulfo-DST)		6.4
1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzene (DFDNB)	aryl halide	3

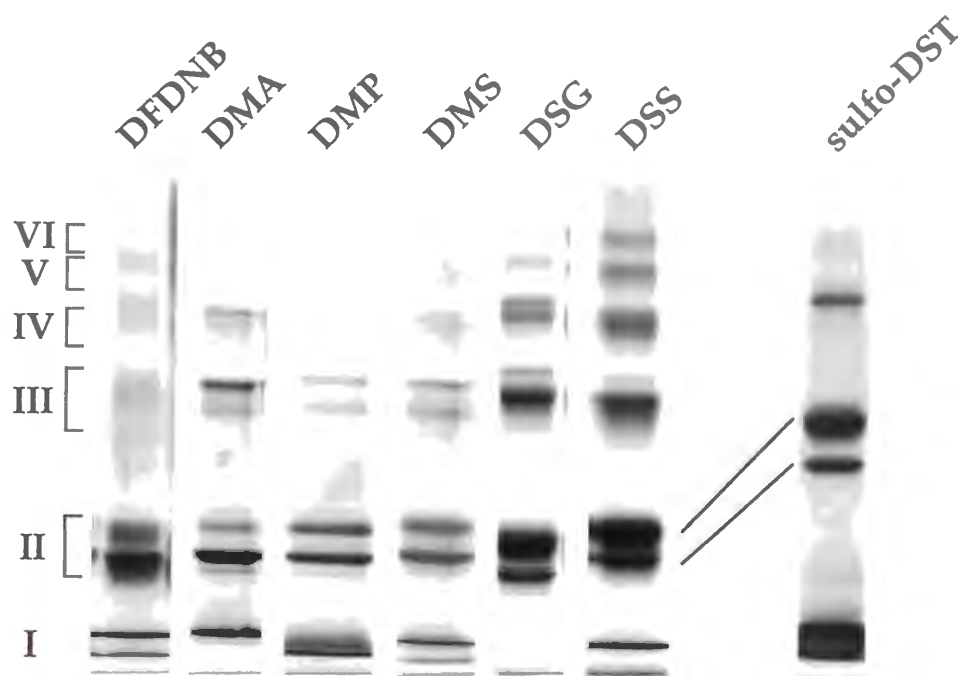


図23 様々な架橋剤による rho 蛋白質のクロスリンク

(IIu) が大きい方のそれ (IIl) よりかなり量が少なかった。このことから IIu の架橋二量体を生じさせるクロスリンク部位は IIl より距離が長いことが予想された。もしそうであるなら、DMA よりさらに架橋長の短いクロスリンク剤を用いれば、IIu を完全に消失させることができるかもしれない。そしてその時のより大きな架橋産物の生成の様子を観察すればシンメトリーの判断ができる。しかしながら imidoester でこれより短いクロスリンカーは入手できなかったので、他の種類の反応基を持つクロスリンカーを用いてこの可能性をさらに調べてみた。

用いたのはいずれも primary amines が架橋される架橋剤で *N*-hydroxysuccinimidoester の sulfo-BSOCOES と DSS、DSG および sulfo-DST、および aryl halide の DFDNB である。

このうち sulfo-BSOCOES を除く全てのクロスリンク剤で rho にクロスリンクを架けることができたが、得られるバンドパターンは imidoester 類によって得られるものとは、さらに、かなり異なっていた。

DSS、DSG および sulfo-DST はいずれも imidoester に比べてクロスリンクの効率が極めて良く短時間で六量体が多く得られた。得られたクロスリンク産物は DMS の場合と同様にやはり二量体から六量体までが観察され、さらに二量体領域には明確に二本のバンドが見いだされた。

しかしながら二本の二量体バンドはその強さが異なり、さらにその量比は DMA の場合と全く逆転していた。すなわち DMA では移動度の大きい方の二量体がたくさんできていたが、DSS、DSG および sulfo-DST では少なく、逆に DMA では少なかった移動度の小さい二量体が、DSS、DSG および sulfo-DST では多く生成していた。

これらのクロスリンク剤によって生じる産物を imidoester によって生じる産物と同じゲルに流すと二種類の架橋二量体の移動度はそれぞれ同じであることから、imidoester によって生じる架橋二量体のうち IIu は *N*-hydroxysuccinimidoester によって生じる架橋二量体のうち移動度の小さい方の産物と全く同じ残基間でクロスリンクが架かっているか、それらの極近傍の残基間で架橋されているものと考えられる。架橋二量体のうち移動度の大きい方の産物も同様に、IIl が生じるのに使われている残基間かその近傍で架橋されていると考えられる。したがって以下ではクロスリンク剤の種類に拘わらず架橋によって生じる二量体のうち SDS-PAGE で移動度の大きい方を IIl、小さい方を IIu と呼ぶ。

DSG と sulfo-DST は DMA より架橋長が短いにもかかわらず DMA とは逆に IIu のバンドが強いことから、DMA で二本の二量体バンドの強さに違いが現れたのは IIu が生じる残基間の距離が DMA では架からないほど遠いからではなく、imidoester で架かりにくい環境にあるからと考えられる。

このことはさらに DFDNB でのクロスリンクではっきりした。このクロスリンク剤は架橋長が 3A しかないにもかかわらず二量体領域にははっきり二本のバンドが観察さ

れ、また六量体まで架橋することができた。すなわち IIU も IIL も架橋残基間の距離はいずれも 3A 以下と考えられる。なお DFDNB によって架橋したものを電気泳動すると同じ分子量であると思われる架橋産物の移動度が架橋反応の時間が長いほど一様になくなっていった。はっきりした原因は分からないが、おそらく架橋にかかわらないリジン残基に DFDNB が反応時間とともにランダムに結合して分子の疎水性が高まるため、より多くの SDS が会合して陽極に引かれやすくなっているものと思われる。いずれにせよ rho 六量体における隣接するサブユニット間の架橋部位の距離はかなり近く、観察された二量体バンドの強さの違いは架橋される残基間の距離の違いではなく、架橋される部位近傍の僅かな環境の違いを反映したものであると考えられる。そして、そのために反応基の種類によってバンドの強さの強弱が全く逆転するものと考えられる。

以上に見たように、架橋長の短いクロスリンク剤を用いることによって二種類の架橋二量体のうち的一方を消滅させることはできなかった。

バンドパターンの検討

しかしながら架橋二量体ではなく架橋三量体のバンドパターンを子細に観察すると rho が D₃ シンメトリーをとるとしたのでは説明できないことが分かった。

Geiselman *et al.* (1992) の実験では泳動後クマシー染色をしているのではっきりしないが、泳動後、銀染色しより微弱なバンドも検出できるようにすると、いずれのクロスリンク剤を用いた場合にも三量体領域が複数のバンドからなることが分かる。そして、これら複数のバンドには強さの強弱があり、かつそれらは二量体バンドの時と同じようにやはりクロスリンク剤の種類によって異なることが分かった。

DMA を用いた場合、先程も述べたように二量体領域では IIL が強い。一方、三量体領域では一番上のバンドが強い。ところが DSG の場合には二量体領域では IIU が強く、三量体領域では一番上のバンドは極めて弱く、その下のバンドが極めて強くなっている。このようなバンドの強弱の対応関係は他のクロスリンク剤を用いたときにも共通

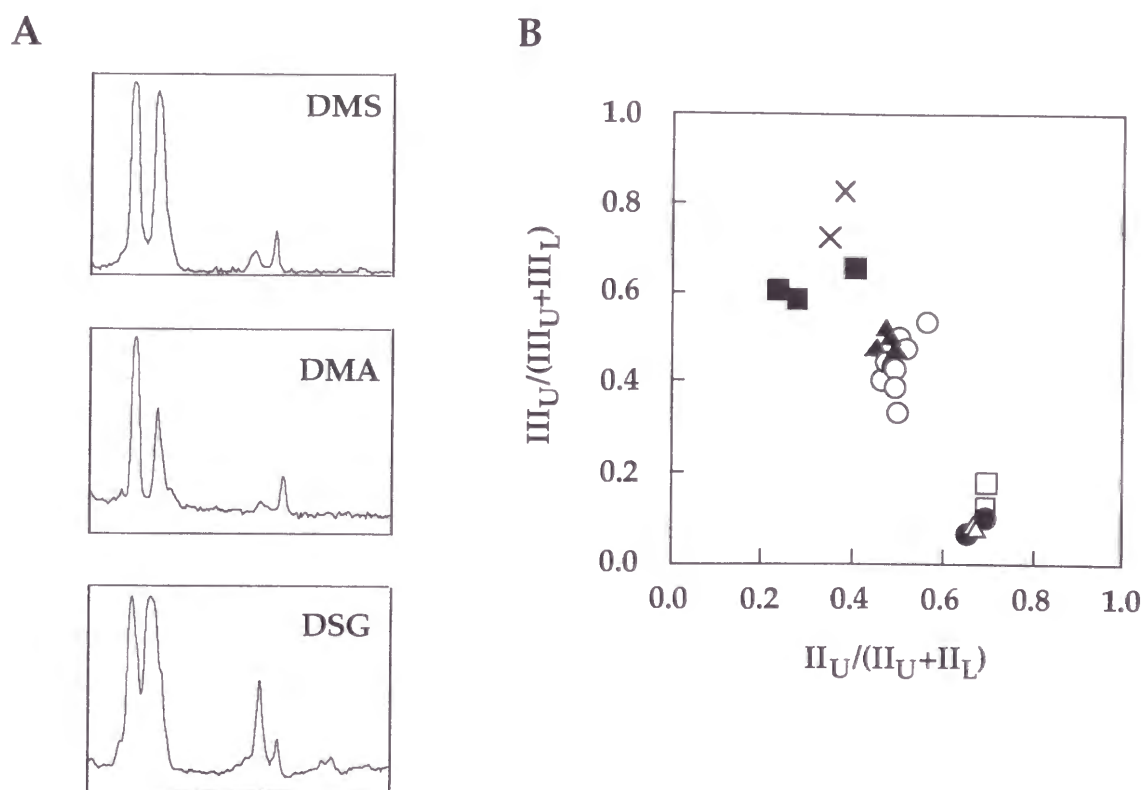


図24 様々な架橋剤によって生じる二量体と三量体の量比

A 異なる三種類の架橋剤による架橋産物をデンシトメーターによって測定した複数の二量体と三量体の量比

B 様々な架橋剤によって生じた二量体と三量体の比率の関係 : X, DFDNB; ■, DMA; ▲, DMP; ○, DMS; □, DSG; ●, DSS; △, sulfo-DST.

で、この二種のクロスリンク剤に特異的な現象ではない。さらに、この強弱は二量体と三量体との間で一定の量的関係にある（図24）。このことは二種類ある架橋の反応速度の違いが、複数存在する二量体および三量体の生成速度の違いに直接反映していると解釈できる。そしてこの結果は D_3 シンメトリーでは説明することができない。

ρ が D_3 シンメトリーをとるとすると、プロトマー間の環境は交互に異なるので二種類の架橋はそれぞれのプロトマー間に一つずつ存在する。仮に、この二種の架橋反応の反応速度がかなり違うものであったとしても、生じる架橋三量体は二種類の架橋を一つずつ持つはずであるから、いずれも同じ速さで生じるはずであり、それらが四量体へ移行する速さも同じであるはずである。従って SDS-PAGE において、三量体の

複数のバンドが同じ強さで出なければならない。しかしながら実際の三量体のバンドは複数存在し、架橋剤によってそれらの強さに差が観察された。この結果は rho 六量体のシンメトリーが D₃ ではないことを示唆しているものと解釈できる。

一方 rho が C₆ シンメトリーをとるとするなら、六つある各プロトマー間は全て同じであり、そこには二種類の架橋部位が存在する。この場合、二種類の架橋の反応速度が異なれば、二量体はもちろん三量体バンドにおいても強さの違いが生じることが容易に説明できる。

以上の観察から rho 六量体が一つのプロトマー間に二種類の架橋部位をもつこと、従って D₃ シンメトリーはとりえないものと判断した。

時間変化の解析

先に述べたようにクロスリンク反応によって生じる各架橋体の量の時間変化から六量体のシンメトリーに関する情報を得ることができる。

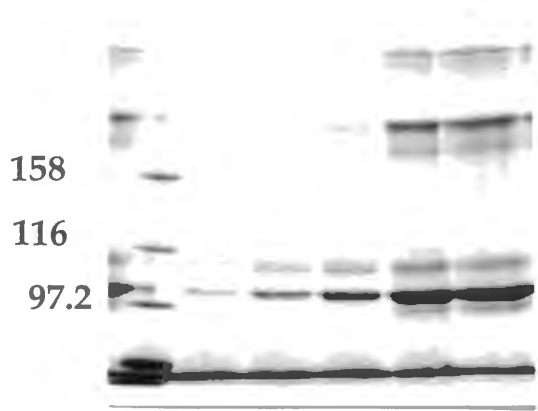
そこでいくつかのクロスリンク剤による架橋反応の時間変化について調べた (図25)。

これまでの実験に使用した架橋剤のうち DMS、DMP、DMA といった imidoester 類は他のクロスリンク剤に比べて加水分解されやすい。したがって解析に十分なほどに架橋反応が進行するに前に反応性を失ってしまい、この実験には適さないことが予想された。実際に調べてみたところ、予想通り架橋反応を長時間行っても二量体、三量体といった比較的小さな架橋体がいつまでも存在し、逆に五量体、六量体といった比較的大きな架橋体の生成は遅く、全体として架橋反応の進行が遅くなってきていることが分かった。したがってこれら架橋剤はシンメトリー解析には不適當と思われた。

一方 N-hydroxysuccinimidoester 類はアミノ基との反応は速いが、加水分解の速度は遅い。したがって N-hydroxysuccinimidoester 類に属する架橋剤 DSS、DSG、sulfo-DST はこの実験に適しているものと考えられた。そこで、ここでは、そのうちの DSG を用いて rho への架橋反応の時間変化を調べた。すると架橋反応は imidoester 類にくらべて著

A

kDa M 0 5" 1' 5' 10'



B

kDa M 0 5" 30" 1' 2' 5' 10' 20' 40'

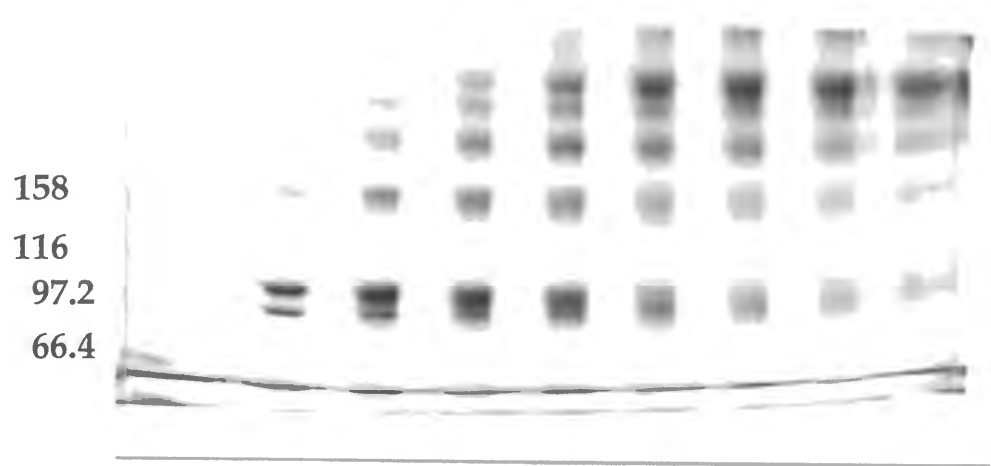


図25 DMA および DSG による rho 蛋白質の架橋反応の時間変化
A DMA
B DSG

しく速く、かつ大きな架橋体の生成が充分に行われて、全体として架橋反応が十分に進行しているものと考えられた。そこでこの架橋反応のデータを基に解析を行った。

解析は、各シンメトリーから理論的に予測される、架橋反応の時間変化と実測値とを比較することにより行った。

シミュレーションにあたっては、以下のような仮定をおいた。1) rho 六量体は架橋反応の間、安定に存在する。2) クロスリンク反応にはアロステリックな効果はなく、全ての架橋可能箇所において全くランダムに反応が起こる。3) 単一のプロトマー間に複数の架橋が可能な部位においても同時には一種類の架橋しかかからない。

まず初めに今問題にしている rho のシンメトリーを考える上で基本となるモデルについて計算した (詳細は補遺参照)。

このモデルは異なる接触面がプロトマー間に交互に現れるもので、D₃ シンメトリーまたは C₃ シンメトリーの場合に相当する。D₃ シンメトリーの場合、理論的には一つの接触面に二本の同等な架橋が生じうる。しかし先に述べたように、観察された二量体のバンドは一回しか架橋されていないものと解釈できる。したがって、何らかの理由によって、一回しかクロスリンクが架からないものと仮定した。

一方、基本モデルの二種類のクロスリンクの反応速度定数を相等しいとするなら、これは一種類しかクロスリンクがかからない、すなわちバンドが一本の C₆ シンメトリーのモデルになる。

C₆ シンメトリーでありながら、一種類のプロトマー間の接触面に二種類の架橋部位が存在する場合は、上記の C₆ モデルにおいて、反応速度定数を $p:(1-p)$ に分割すればよい。こうすることによって、複数存在する二量体や三量体のバンドの量比を計算することができる。

上記のモデルうち D₃/C₃ シンメトリーモデルの特徴は、 $k\alpha$ と $k\beta$ の比率を1から変化させると、三量体と五量体のピーク値が二量体、四量体のそれに対して相対的に低下することである。一方 C₆ シンメトリーモデルの場合には、 $k\alpha$ と $k\beta$ の比率を変化させても、ピークの高さは必ず二量体、三量体、四量体、五量体の順に次第に低くなり、

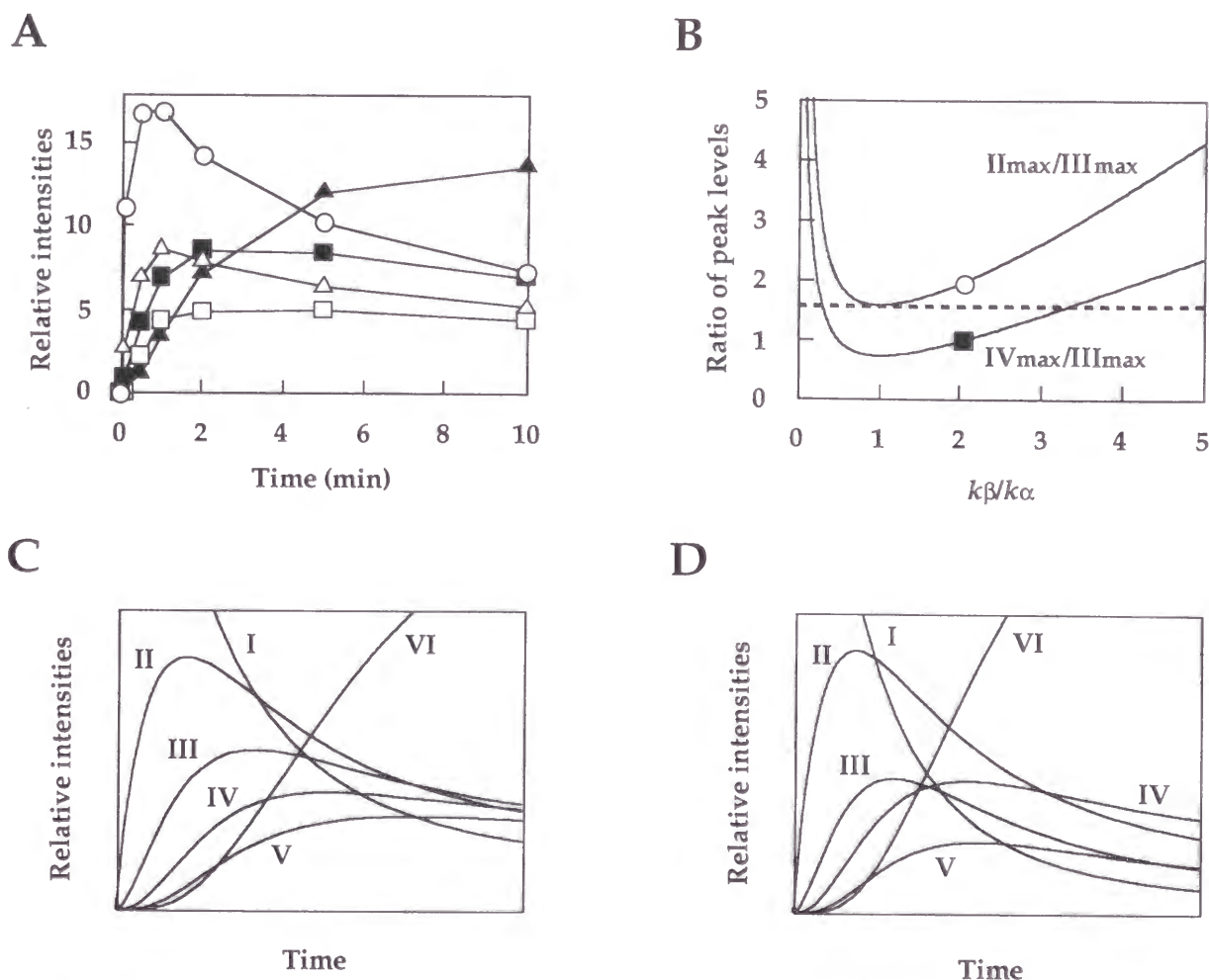


図26 計算によって得られた架橋反応の時間変化と実測値との比較

A DSG による架橋反応の実測値。○, II; △, III; ■, IV; □, V; ▲, VI。

B 二量体と三量体のピークの比および四量体と三量体のピークの比を $k\beta/k\alpha$ の関数として計算した結果 (実線) と実測値。○, II_{max}/III_{max}; ■, IV_{max}/III_{max}。

C シンメトリーの場合の架橋反応の時間変化の計算値。

D D₃ シンメトリー、C₃ シンメトリーあるいは C_{3/6} シンメトリーの場合の架橋反応の計算値。計算するにあたって $k\beta/k\alpha$ あるいは κ_2/κ_1 に B から求めた値2を代入して行った。なお C、D の横軸 (Time) を求めるにあたっては以下の関係式を用いた。

$$\tau = \int_0^t C dt = \int_0^t C_0 \exp(-k_d t) dt = C_0 / k_d \{1 - \exp(-k_d t)\}$$

ここで C は時刻 t における架橋剤の濃度であり、これは初濃度 C_0 から速度定数 k_d で指数関数的に減少するとみなせる。なお C_{3/6} シンメトリーの場合に、

$$(C_0 / R_0)(k_1 / k_d) = 1.5$$

を代入した時、実測値に最もよくフィットした。

逆転することはない。

実際の架橋反応の時間変化を DSG の場合について調べてみると、得られた結果は rho 六量体が C₆ シンメトリーを取っていると考えたのでは、上手く説明できないことが分かった (図26)。すなわち、二量体から五量体までのピークの高さを比較すると、C₆ シンメトリーの時に期待されるような、二量体から五量体まで順番に高さが低くなるような関係ではなく、D₃/C₃ シンメトリーの場合のような、二量体から五量体まで交互に高さが変化する関係であった。また二量体の比率も時間に伴って変化するが、これもこのシンメトリーモデルでは説明できない (図27)。

しかしながら全てのプロトマー間には架橋が二つずつ存在することは既に見たとお

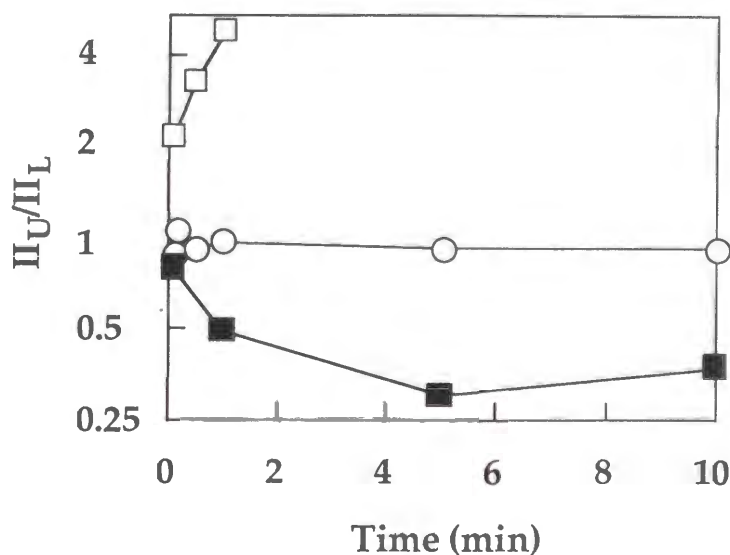


図27 二種類の二量体の架橋反応時間に対する比率の変化
□, DSG; ○, DMS; ■, DMA。

りである。すなわち D_3/C_3 シンメトリーモデルを取るとは考えられない。

そこでゲル上でのバンドパターンと架橋産物の時間変化の双方を満足させるモデルとして次のようなものを考えた。すなわち ρ の各プロトマーは基本的には全て同じ方向を向き、二種類の架橋は各プロトマー間の全て同じ位置でかかるが、架橋反応の速度がプロトマー間で交互に異なる。これは大局的には C_6 シンメトリーであるが、架橋反応の速度という観点からは各プロトマー間で交互に微妙に違いのある C_3 シンメトリーと見なすものである。このシンメトリー構造をここではその特徴を明示するため、特に $C_{3/6}$ シンメトリーと呼ぶことにする。

$C_{3/6}$ シンメトリーの場合の架橋産物の時間変化を計算してみると、二量体から五量体まで実測値を上手く説明することができることが分かった。また、 C_6 シンメトリーモデルでは説明できない二種類の二量体の比率の時間変化も説明することができる。

以上の検討の結果、 ρ 六量体は $C_{3/6}$ シンメトリーをとるものと考えられた。

SDS 存在下でのクロスリンク

Geiselman 等は D_3 モデルで想定される二種類のサブユニット接触面は構造が全く異なっているので、蛋白質変性剤による攪乱に対して感受性が違っている可能性が高く、したがって SDS などの存在下でクロスリンクを行うと、二種類の二量体のバンドのうちどちらか片方が優先的に弱まるのではないかと予測した。そうであれば二量体に比べて、それより大きな架橋体のバンドは急激に消失するはずである。1% SDS 存在下で架橋を行うと、実際にそのような結果が得られた。このことも、また ρ が D_3 シンメトリーをとることの根拠とされている。

この実験についてもより巾広い濃度の SDS を用いて追試を行ってみた (図28)。結果は彼等が記載したよりもはるかに複雑で、SDS の濃度が0.01%の場合には、六量体より大きな架橋産物さえ観察され、また SDS の濃度を1%まで上昇させると、今度は SDS 無しの場合には観察されなかった新たなバンドが観察された。これらの事実は

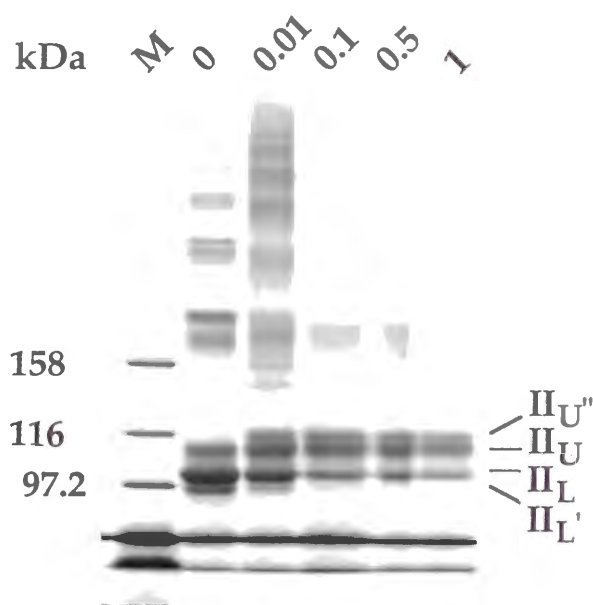


図28 SDS 存在下での DMA による架橋反応
 SDS なし、および 0.01% から 1% の SDS 存在下での架橋産物の比較。

SDS 存在下では、その濃度によって rho 蛋白質のコンフォメーションが様々な程度に変化し、それに伴って既存のクロスリンクの消長だけでなく、新たなクロスリンク部位の出現さえも引き起こされたことを示唆する。このように SDS 存在下での rho の四次構造は正常な状態からかけ離れていることが明らかとなったため、Geiselman 等の D₃ シンメトリー・モデルはここでも根拠を失った。

半変性ゲルによる解析

最後に MTAB を用いた半変性ゲルによる実験について述べる。

Geiselman 等は、SDS より穏やかな変性剤である MTAB および CTAB を用いて半変性状態で rho の電気泳動を行い、強い二量体バンドと四量体バンドおよび弱い三量体バンドを検出した。この結果は rho が D₃ シンメトリーをとることの一つの根拠とされ

1 2



図29 MTAB 存在下での rho 蛋白質の電気泳動
レーン1：20 μ M rho、レーン2：40 μ M rho。

た。仮に C_6 シンメトリーをとるなら、二量体から六量体までのバンドのラダーが観察されるはずである。一方 D_3 シンメトリーであるなら二量体が単位となるので二量体とその倍数体のバンドが出やすくなるはずだからである。

そこで MTAB を含むゲルに native の rho をアプライして電気泳動してみた (図29)。ところがアプライする蛋白質の量を変えたり、MTAB の濃度を変えるなどいくつかの条件で再三、実験したにもかかわらず Geiselmann 等の結果は再現されなかった。得られたバンドは単量体と思われるバンドと二量体と思われるバンドのみである。

この結果は確かに rho は安定な二量体を形成することを示唆するものと考えられる。しかし、強い四量体と弱い三量体のバンドが観察されないため、 D_3 あるいは C_3 シンメトリーをとるため二量体のバンドが観察されるのか、それとも C_6 シンメトリーを取るが、ゲル中で三量体以上が不安定のため二量体のバンドしか観察されないのか判断はできない。したがってこの実験結果からシンメトリー情報を得ることはできなかった。

また Geiseimann 等の結果が仮に再現されたとしても、rho 六量体が $C_{3/6}$ シンメトリーを取るとすれば二量体が安定に存在することを説明することができる。

考 察

第一節 NusG と rho との相互作用

λ N 蛋白質による抗転写終結効率を上昇させる因子として同定された NusG は *in vivo* および *in vitro* の実験から rho 依存性転写終結に関与することが明かにされていた。特に *in vitro* の実験からは rho 蛋白質と NusG 蛋白質とが直接結合すること、NusG 蛋白質の添加により rho 依存性転写終結がより早い段階ですなわちよりプロモーターに近い領域で起こるようになること、さらに rho 単独では働けないような高塩濃度下でその転写終結能を回復させることなどが明かにされた (Li *et al.*, 1993)。NusG のこのような作用はどのような機構によって引き起こされるのであろうか。Li *et al.* (1993) は NusG 蛋白質の存在によって短い転写産物が生じるようになったことから NusG は rho が相互作用するのに必要な RNA の長さを短縮する働きがあるのではないかと指摘しているが、これは結果を単に言い換えたにすぎない。

そこで本研究ではさまざまな変異 rho 蛋白質を NusG と共存させて *in vitro* RNA 合成を行ないその結果を比較することにより NusG 蛋白質の rho 依存性転写終結における役割解明のヒントを得ようと試みた。

変異 rho の中には NusG の効果の全く見られないものもあったが多くの転写終結活性が促進される傾向が認められた。

まず野生型 rho 蛋白質の場合、従来の報告同様 NusG 蛋白質の存在によって、プロモーター領域により近い部位での転写終結が増加していた。さらにこれまで報告のなかった新しい転写終結部位が見つかった。

グループ I と II に属する変異 rho 蛋白質はいずれも NusG の有無にかかわらず rho 依

存性転写終結は起こらなかった。

グループ III に属する三種の変異 rho 蛋白質はいずれもそれだけでは転写終結を引き起こせないものであるが NusG の共存によってある程度転写終結をおこせるようになった。このグループの変異 rho 蛋白質はいずれも ATP に対する結合能は野生型とほぼ同等であり poly(C) をアクチベーターとしたときの ATP 加水分解活性も野生型の 4 割前後と比較的高い活性を保持している。しかしながら RNA との結合能は弱く、特に M341V と E342G とはこの能力が著しく低下している。これらの結果を考え合わせるとこのグループの変異 rho 蛋白質は、RNA との相互作用が弱くなっているためにそれ単独では転写終結をほとんど引き起こせないが、NusG の存在下ではその相互作用が増強するために転写終結活性がある程度回復するものと考えられる。

グループ IV はいずれもそれだけで野生型以上に強い転写終結活性をしめすが、NusG 蛋白質が共存すると、それがより強まることがあきらかとなった。グループ IV の変異 rho 蛋白質はいずれも poly(U) をアクチベーターとしたとき野生型より高い ATP 加水分解活性を示す。また RNA との結合能も野生型と同等以上の能力を示す。それがなおかつ、さらに促進されるということは、もし NusG に rho 蛋白質の RNA 相互作用を強くする働きがあるとするれば、その作用はかなり直接的なものである可能性を示唆する。うがって言えば、rho と結合した状態で NusG は RNA と直接何らかの相互作用をするのかもしれない。メカニズムは別として、IV 型 rho と NusG との共存下では、単に既存の rho 依存性転写終結部位での終結が高まるだけでなく、それより遥に上流の新しい部位での終結が起こるようになる点が注目された。この型の rho 変異が細胞の増殖阻害を示すのは、そのような早すぎる転写終結が *in vivo* でも起こるためであろう。

逆にグループ I と II とで NusG が共存しても転写の終結がおきなかったことはこのグループの変異 rho 蛋白質が NusG の助けを借りても転写終結を引き起こせないくらい RNA との結合に欠陥があるのか、あるいは他の機能、例えば ATP 加水分解能に欠陥があるためではないかと考えられる。

グループ V は *in vitro* では野生型と同様に転写終結を引き起こすが *in vivo* では転写終結を引き起こさなくなるものである。このことは細胞内にはあるが *in vitro* の実験系には含まれていない何らかの因子が *in vivo* でそれを抑制している可能性が考えられる。NusG 共存下で転写終結を行なわせてみるとグループ IV 同様よりプロモーターに近い領域で転写終結が起こるようにはなっているが、野生型では NusG 共存下でかなりよく止っていた *rut* 部位での転写終結がかなり弱い。この型の rho 蛋白質は NusG に対する感受性がやや弱いようだ。そしてこのことが *in vivo* での転写終結がおこっていない一つの要因である可能性もある。すなわち NusG の存在する *in vivo* では転写終結に際して NusG とこの変異 rho 蛋白質とが相互作用し本来転写終結が起こるべきところで転写終結が起こらず無用な遺伝子の発現が起こり、その発現した遺伝子産物が菌の成育に悪影響を及ぼしている可能性が考えられる。この場合 NusG と変異 rho 蛋白質との相互作用によって単に RNA に対する親和性が高まるだけなのか、それとも認識されるべき RNA の塩基配列特異性ないし構造が変化するのであろうか。

rho 依存性転写終結において、rho 蛋白質による RNA の認識は最初の重要なステップである。その解析を行なう上に変異 rho 蛋白質と NusG 蛋白質とを利用することが非常に有効であることが本研究で示された。

第二節 rho 蛋白質の高次構造

クロスリンクによる rho 六量体のシンメトリー解析

大腸菌転写終結因子 rho は転写終結を引き起こす際、六量体を形成して機能する。したがって、六量体の中のサブユニットの配置がどうなっているかを知ることは rho のヘリカーゼ作用や tracking プロセスのメカニズムを考えるうえで重要である。

この六量体は電子顕微鏡やいくつかの物理学的測定から平面上に六つの単量体がドーナツ状に会合したものであると考えられている (Bear *et al.*, 1988; Gogol *et al.*, 1991; Geiselman *et al.*, 1992a; Geiselman *et al.*, 1992b)。これまでにいくつかのグループが rho の結晶化に取り組んでいるが、残念ながら未だ成功していない。そのような現状にあつて、Geiselman 等は主にクロスリンク実験をもとにこの六量体のシンメトリーを推定し、そこからさらに rho と RNA との相互作用モデルを提唱した (Geiselman *et al.*, 1992, 1993)。

Geiselman 等によれば、このドーナツ状の六量体を取りうるシンメトリーは四種類ある (Geiselman *et al.*, 1992)。それらは C_6 、 C_2 、 C_3 、 D_3 シンメトリーの四種である。これら四種類のシンメトリーは解離・会合する時の挙動が互いに異なるものと予想されるので、解離・会合の様子を調べることによって rho 蛋白質の六量体が、実際にこれら 4 種のうちのどのシンメトリーをとっているのか推定することができると期待される。

実際に rho に DMS を用いて、クロスリンクを架けると、二量体領域に二本の異なる移動度を示すバンドが観察された。この結果は、rho 六量体のプロトマー間には二種類の二種類の接触面が存在すると解釈された。従つて rho は一種類の接触面しかない C_6 シンメトリーをとるのではなく、三種類の異なる接触面をもつ C_2 シンメトリーをとるのでもなく、二種類の接触面をもつ D_3 シンメトリーあるいは C_3 シンメトリーをとるものとされた。さらに C_3 シンメトリーでは一つのプロトマーに隣接するプロトマーと

の接触部位を4箇所想定しなければならないのに対し、D₃ シンメトリーでは2箇所であり、ことからより単純な D₃ シンメトリーが最も確からしいと結論された。

このモデルでは rho 六量体はプロトマーの上下が交互に入れ替わり、それに伴って N 末が上、下、上、下、上、下と入れ替わる。rho の N 末には RNA 結合モチーフが存在することから、RNA は rho の N 末に沿って波うつように六量体の外周を取り囲んで相互作用するというモデルが提唱された (Geiselman *et al.*, 1993; 図16)。またこの相互作用部位が ATP の加水分解に伴って一つずつプロトマーを移動し、結果として RNA 上を移動するというモデルも提唱された。

しかしながら rho 六量体中に二種類の接触部位が存在するとしても、それらがいずれも同一のプロトマー間に共存する可能性もある。つまり、二種類の架橋された二量体が観察されたからといって直ちに接触面は二種類存在するとはいえない。

さらに以前より rho 蛋白質との間にアミノ酸配列上の相同性が指摘されていた F₁-ATPase の結晶構造が明らかにされた (Abrahams *et al.*, 1994)。それによれば rho と相同性のある F₁-ATPase の α サブユニットと β サブユニットとは、ほぼ同じ三次構造をとること、両方が三つずつ交互にリング状の六量体を形成すること、そして、その六量体は偽 C₆ シンメトリーであることが明らかとされた。このことは rho は D₃ シンメトリーではなく C₆ シンメトリーないしそれに類するシンメトリーをとる可能性が高いことを意味する。

F₁-ATPase と rho との sequence alignment を見ると、 α サブユニットと β サブユニットとの間で保存されている箇所では rho においてもアミノ酸が保存されている (図17)。特に ATP 結合に関与すると考えられてきた Walker の ATPase motif A においてアミノ酸がよく保存されている。このことは明らかとされた三次構造とつきあわせて考えるとよりはっきりする。図18に示したのは F₁-ATPase β サブユニットの ATP 近傍のアミノ酸である。このうち印をつけた大部分のアミノ酸残基が rho においても保存されている。とりわけ重要なのは α サブユニットの R373 である。この残基は隣接する β サブユニットの ATP 結合部位にあって β サブユニットの ATP 結合を支えている。この残基

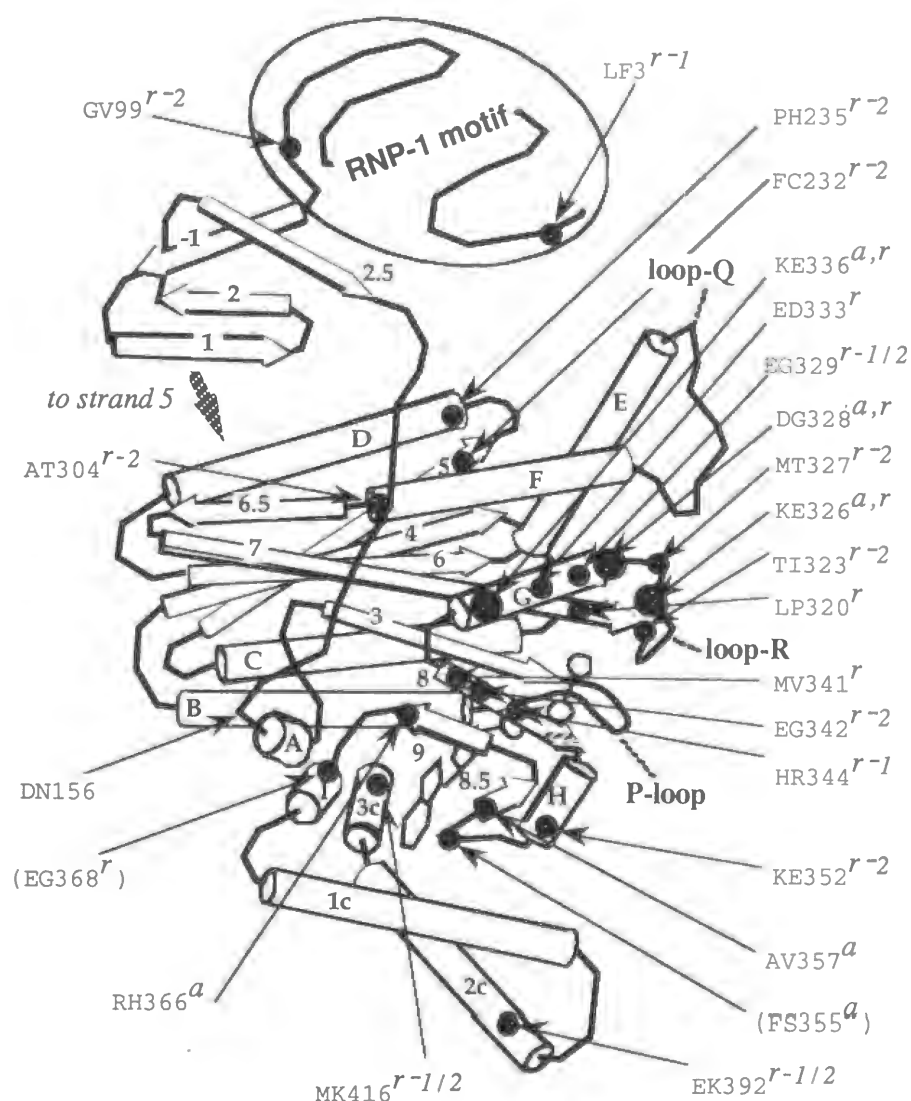


図30 rho 蛋白質の三次構造モデル

が rho でも保存されている。もし rho が F₁-ATPase とは違って D₃ シンメトリーをとるなら、このような ATP 結合が上手く説明できない。

さらに我々の研究室で蓄積してきた rho 変異体の変異部位を F₁-ATPase の β サブユニットの三次構造上にプロットしてみた (図30)。すると ATP 結合に欠陥のある変異はすべて ATP 近傍におちた。このことは rho が F₁-ATPase と同様な三次構造をとること

を意味する。そうであるなら rho は F₁-ATPase と同様な四次構造をとる可能性が高い。

Hajdu 等は複数の架橋剤を用いて、架橋反応の時間変化を追うことで、aldolase と lactate dehydrogenase の四次構造のシンメトリーを推定することに成功している (Hajdu *et al.*, 1976)。そこで本研究では彼等の方法を応用して rho のシンメトリーについて調べてみた。その結果は、rho が D₃ シンメトリーをとると考えるのでは説明できないものであった。すなわち DMA および DSG でクロスリンクをかけ SDS-PAGE をして得られた複数の二量体と三量体のバンドの量比の違いを矛盾無く説明できるのは D₃ シンメトリーではないことが分かった (図23)。しかしながら、それらの時間変化は単純な C₆ シンメトリーでも説明することが出来ないものであった。架橋反応の解析が要請する rho 六量体の四次構造は、各プロトマー間にそれぞれ異なる二カ所ずつの架橋部位が存在すること、しかしプロトマー間の環境が交互に少しずつ異なるということである。この両者を満足させるシンメトリーは C₃ シンメトリーであることが明らかとなった (図26)。ただし、この C₃ シンメトリーは限りなく C₆ シンメトリーに近いものであるので、ここでは、この微妙にズレのある C₃ シンメトリーの四次構造をその性質を言い表すために、C_{3/6} シンメトリーと特に呼ぶことにした。

Geiselmann 等は D₃ シンメトリーの根拠として、クロスリンク実験の他にも SDS 存在下でのクロスリンク実験、MTAB 存在下での PAGE、蛍光測定をはじめ、その他の rho がもつ諸性質をその根拠として挙げている。以下にそれらについても検討する。

まず Geiselmann 等は二種類の架橋二量体のうち一方が SDS に対してより感受性が高いという可能性を考えた。彼らが SDS 存在下で実際に得た結果は、二量体バンドが観察されたが、それより大きな架橋産物は観察されなかったというものである。しかしながら、彼らは文中で二量体バンドは二本とも観察されたとしているので、これは SDS 存在下で単に rho が会合しにくくなって三量体以上ができ難くなったものと解釈することも可能である。つまり、これはプロトマー間の環境が交互に異なることを示す根拠とは言えない。

実際に本研究において、SDS 存在下で rho にクロスリンクをかけ SDS-PAGE を行っ

てみたところ、極めて低濃度の SDS 存在下ではむしろ六量体以上のバンドが観察され、rho の会合状態に変化が起きている可能性が考えられた (図28)。これは rho 六量体がスタックして十二量体ができていることを示しているのかもしれない。それは D₃ シンメトリーであっても C₆ シンメトリーであっても、もちろん C₃ シンメトリーであっても起こりうることである。さらに SDS 濃度を高めると、確かに二量体のバンドのみが観察されるようになったが、SDS 非存在下では観察されなかった新たなバンドが二量体領域に出現し、rho の高次構造に変化の現れていることがやはり示唆された。これもまたどのシンメトリーであっても起こりうることであって、いずれのシンメトリーであるかを峻別する証拠とはなりえない。

これらの事実は SDS 存在下では、native の高次構造を反映していない可能性を示唆するものであり、この条件でのクロスリンク実験によっては rho の高次構造を解明することが難しいことを示している。

次に MTAB のような穏和な変性条件で電気泳動を行い、rho の会合状態を調べた。Geiselmann 等はこの実験で三量体、四量体のバンドを観察している。この結果は再三の追試にもかかわらず再現しなかった (図29)。しかし、本研究で呈示した C_{3/6} モデルであれば、二量体が条件によっては安定に存在することが説明可能であるので、仮に MTAB 存在下で三量体や四量体のバンドが観察されたとしても十分に説明可能である。

rho はシステイン残基を一つしかもたない。この残基を fluorescein で修飾し、その励起エネルギー移動から算出したシステイン残基間の距離が 45Å であったことも、D₃ シンメトリーの一つの根拠とされた。すなわち、C₆ シンメトリーをとったのではシステイン残基間の距離が短くなりすぎるが、D₃ シンメトリーの場合には隣接するサブユニットでシステイン残基の位置が上下に振れるので十分 45Å の距離をとることができる。したがって C₆ シンメトリーは取り得ないとされた。

しかしながら rho 六量体の半径は 69Å あり、隣接するサブユニットの同一のアミノ酸残基間の距離は C₆ シンメトリーの場合でも最大で 69Å でありうる。したがって仮に C₆ シンメトリーをとったとしてもシステイン残基間の距離を 45Å とすることは可能で

あり、これは D₃ シンメトリーの根拠とはなりえない。実際、F₁-ATPase の三次構造上を基礎に rho の高次構造を考えた場合、システイン残基は六量体の外縁部に存在する。

rho 蛋白質は ATP に対する親和性の高いサイトを六量体あたり三つ弱いサイトを三つ、また RNA に対する親和性の高いサイトも六量体あたり三つ、弱いサイトが三つ存在することが生化学的な解析から示唆されている。このため rho は二量体をその機能単位としているのではないかと考えられてきた。また変異 rho を wild type の rho と混合して活性を調べたところ、活性の低下は rho が二量体を機能単位としているとすると解釈しやすいものであった (Richardson and Ruteshouser, 1986)。

これらの知見も rho 六量体が C_{3/6} シンメトリーを取ると考えれば、二量体が一つの単位となっていると見なすことができるので、合理的に説明可能である。

rho 蛋白質は濃度が低かったり、高塩濃度の下では六量体ではなく安定に二量体をとる。このこともまた C_{3/6} シンメトリーを基に考えれば、十分説明可能である。

このように本研究で得られたクロスリンク実験の結果も、従来知られている rho の生化学的な諸性質も、F₁-ATPase との構造上の類似性も rho 六量体が C_{3/6} シンメトリーをとると考えれば全て上手く説明することができる。

ところで、rho 蛋白質にトリプシンを作用させると、まず初めに K283-V284 の間で切断が起こること、ならびにその切断は ATP の共存下では早く、RNA の共存下では遅くなることが知られている。このことは、これらのリガンドの存在によって rho 蛋白質の高次構造に何らかの変化が生じることの現れと解釈できる。本研究において、予備的にこれらリガンド存在下でクロスリンク反応を行ってみたが、リガンドが存在しない場合と比べて顕著な差は検出されなかった。おそらく四次構造の大枠は変化せずに、ここのサブユニットの三次構造がトリプシン切断では検出されるような仕方で変化しているものと考えられる。

リング状六量体を形成するヘリカーゼ群

これまでに六量体を形成するヘリカーゼはいくつか知られている (表5)。このうちそのシンメトリーまで調べられているものがいくつかあるが、それらはいずれも C₃

シンメトリーか C6 シンメトリー、あるいはその混合したものである。

Escherichia coli の DnaB は DNA 複製に先だって ATP を加水分解しながら二本鎖 DNA を一本鎖に解離する蛋白質であるが、幅広い濃度条件下で安定に六量体を形成する。またこの蛋白質は ATP に対する強い親和性のサイトを六量体あたり三つ、弱いサイトを三つもつ。超低温電子顕微鏡法による観察から、この蛋白質は C3 シンメトリーと C6 シンメトリーの六量体の混合したものであることが明らかとされた。

この他、やはり DNA 複製に関与する T7 gp4 が C3 シンメトリーの六量体をとることや、ホリデー・ジャンクションの分岐移動に関わる大腸菌の RuvB が C6 シンメトリーの六量体をとることなどが知られている。さらに組み替え、修復に関与する RecA も従来、DNA 上に螺旋状に巻き付くことが知られていたが、条件によっては C3 または C6 シンメトリーのリング状の六量体をとるという報告もある。

これらの蛋白質は、いずれもヘリカーゼであり、ATPase でもある。構造上は共通に Walker の ATPase motif をもち、リング状の六量体を形成し、かつその六量体は C3 か C6 シンメトリーである。これらの点で rho と共通の性質をもっているといえる。したがってリング状の六量体を形成するヘリカーゼ群は F1-ATPase とともに一つの大きなファミリーを形成するものと考えられる。

さらに rho を除くこれらの蛋白質群には共通の性質が指摘されてきた。それは、い

表6 六量体を形成するヘリカーゼ

Helicase	Symmetry	Unwinding polarity	Function
<i>E. coli</i> DnaB	C3/C6	5' to 3'	replicative DNA helicase
<i>E. coli</i> Rho	C3/6	5' to 3'	transcription termination
<i>E. coli</i> RuvB	C6	5' to 3'	branch migration motor
T4 gp41		5' to 3'	replicative DNA helicase
T7 gp4	C6	5' to 3'	replicative DNA helicase, primase
SV40 large T antigen	C6	3' to 5'	replication initiation

ずれもが六量体リングの中心を通す形で核酸と相互作用するということである。従って、rho がこれらの蛋白質と構造機能的に類似しているのであれば、従来考えられてきたような rho と RNA との相互作用様式、すなわち六量体を取り巻くように RNA と相互作用するのではなく、rho もまた六量体リングの中心を通すという形の相互作用を RNA と行う可能性が高い。

残念ながら本研究においては、その点を追求するまでには至らなかったが、rho 蛋白質と RNA との相互作用を考える上で今後の最も重要な課題の一つであると言えよう。

rho 依存性転写終結モデル

序論でも述べたように、rho 依存性転写終結のメカニズムとしては大きく二つの様式が考えられている（図4）。一つは looping model と呼ばれ、rho の RNA 結合部位に RNA がいったん結合すると、それだけで RNA ポリメラーゼ 近傍の rho の相対的濃度が上昇するため、あとは rho と RNA ポリメラーゼが直接相互作用して、転写の終結を引き起こすというもの。もうひとつは tracking model と呼ばれ、いったん RNA と結合した後、rho は RNA 上を移動して、RNA ポリメラーゼと相互作用するというものである。しかしながら、現在もっとも有力なモデルは両者の折衷モデルである tethered tracking model である。すなわち rho は転写終結部位の120塩基程上流の RNA に結合し、その結合は保持しながら RNA 上を移動して RNA ポリメラーゼに相互作用し、最終的に転写終結を引き起こす。

このモデルと本研究で提出した rho 六量体の構造モデルとの整合性について以下に検討したい（図31）。

tethered tracking model は、rho が二種類の RNA 結合部位を持つことを要請する。すなわち、強く RNA と結合する部位と RNA 上を移動する際に離れない程度の比較的弱い相互作用をする部位の二つである。また、RNA 上を移動することも要請される。

Geiselman 等の D3 シンメトリーを基にした rho と RNA との相互作用モデルでは rho が RNA に沿って移動することは説明できるが、最初の RNA との結合を保持し続ける

ということを上手く説明することができない。

C3/6 シンメトリーモデルの場合、六量体リングの中心を RNA が貫通しているとすれば rho は looping によって RNA ポリメラーゼと相互作用するのではなく、必然的に RNA 上を tracking することになる。

一方、二種類の RNA 結合部位についてであるが、rho は、N 末に RNA 結合モチーフをもつドメインを持ち、ATPase motif はそれより C 末の領域に存在する。他の六量体と共通する領域はこのうちの C 末領域である。従って rho の N 末ドメインはヘリカーゼ活性とは独立に、独自に機能を果たす可能性が考えられる。一方、rho の C 末2/3の領域はヘリカーゼとして共通する三次構造をとっている可能性が考えられる。ヘリカ

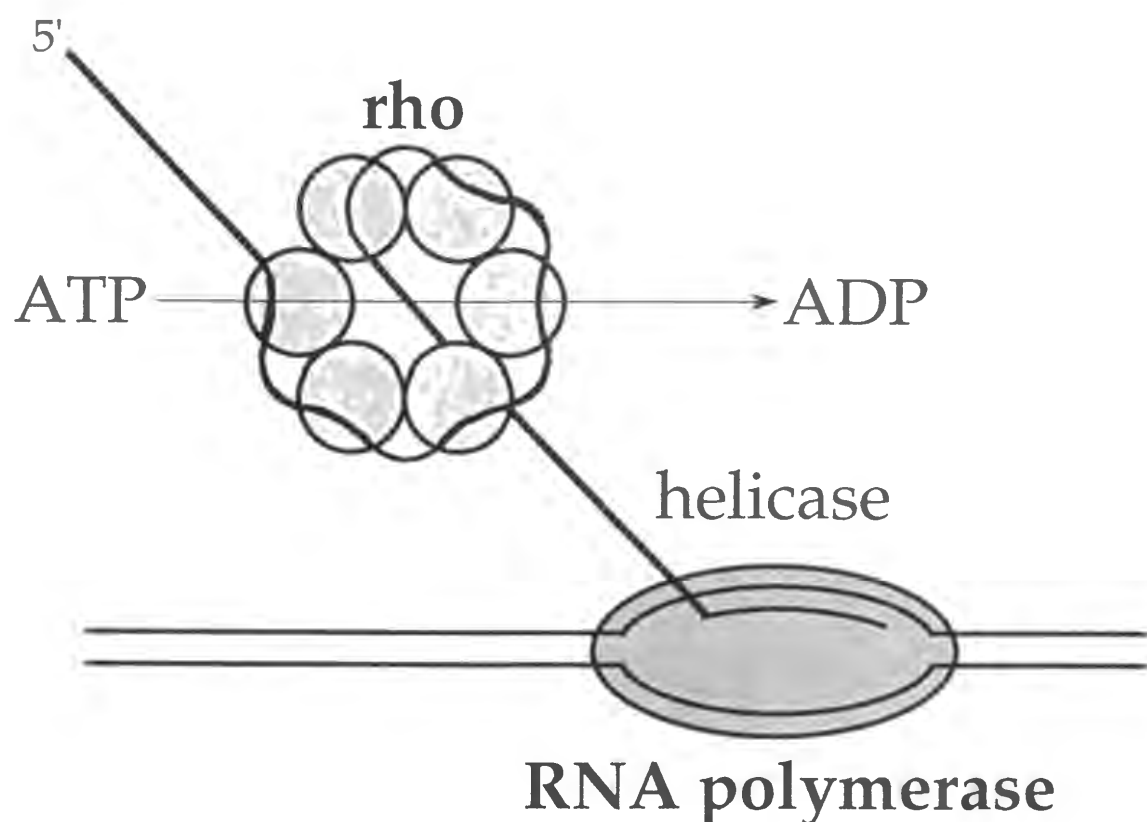


図31 C3/6 シンメトリーモデルの基づくrho 依存性転写終結機構のモデル

一ゼはいずれも核酸と相互作用するので、ヘリカーゼ間で共通する部位でこの相互作用が起きると考えることができる。そこで、rho 蛋白質の N 末の RNA 結合ドメインが C 末のドメインとは別個に RNA との強い結合部位を形成し、残る C 末領域が RNA との弱い結合部位と考えれば、tethered tracking model が要請する二種類の核酸結合部位を上手く説明することが出来る。C_{3/6} シンメトリーモデルでは、六つのプロトマーの N 末ドメインが六量体の一方に集まっており、またヘリカーゼドメイン同士でリングを形成していると思えるので、六量体全体で見てもこの RNA 結合に関する役割分担は十分あり得ると思われる。

ATPase 活性を介した RNA 結合の解析より、rho 蛋白質は二種類の異なる RNA 結合部位を持つことが示唆されている。それらはそれぞれ primary 部位と secondary 部位と呼ばれる。primary 部位は60塩基長以上の single strand の RNA ないし DNA と結合し、特に C 塩基を含むと親和性が高くなり、その親和性も RNA に対しては $K_a=10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、DNA に対しても $K_a=10^8 \text{ M}^{-1}$ と高い。一方 secondary 部位は8塩基長の RNA で飽和し、必ずしも C 塩基を要求しない。その結合は ATP の結合と関係し、親和性は低い。また DNA は結合できない。

実際、hydroxylamine によって生成した rho の N 末ドメインのみで RNA 結合能を示し、その結合特性は C 塩基を好むことが示されている。したがってこのドメインが primary site を担っていると考えて、間違いないであろう。逆にヘリカーゼドメインは RNA 上を移動していくのに必要な程度の弱い結合部位として secondary site を担っていると考えることが出来る。

すなわち C_{3/6} シンメトリーモデルで考えた場合、rho 六量体の N 末ドメインの部分で RNA と強く結合し、その結合は維持したまま、ヘリカーゼドメインで RNA と弱い相互作用をしながら RNA 上を移動して転写複合体の部位まで到達し、最終的に RNA ポリメラーゼと相互作用し、転写終結を引き起こす、という tethered tracking model に基づいた転写終結機構のモデルを考えることが出来る。

さらに変異 rho の解析から C 末の変異 (MK416) で NusG との相互作用に変化が観

察されたことから C 末部分で rho と NusG とが相互作用する可能性も考えられる。

本研究により rho 因子は、 $C_3/6$ シンメトリーのリング状の六量体をとることが明らかとなった。

構造機能上の類縁性から考えて、rho 因子はそのリングの中心に RNA を通している可能性が強まり、rho の高次構造とつきあわせて tethered tracking model を議論することができるようになった。

今後の課題として、実際に rho 六量体のリングの中央を RNA が通っているのか明らかにする必要がある。また、従来の生化学的解析より、rho は核酸に対する結合の特性から分けしうる、二種類の核酸結合部位を持つとされてきた。これらが、実際に rho 蛋白質の構造上何処に位置するのか。どのような相互作用をするのか、を明らかにする必要がある。

これら rho と RNA との相互作用様式を明らかにすることが、現在 rho 依存性転写終結機構を解明する上で最も重要な課題であろう。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり終始適切な御指導ならびに助言をして下さいました重定勝哉先生に深く感謝いたします。また貴重なサンプルや資料を提供して下さいました三輪佳宏博士、折りに触れ有意義な議論に参加していただいた九十九伸一氏をはじめ赤松謙子博士、鹿児島浩博士ほか京都大学ウイルス研究所遺伝子動態調節研究部門の皆様にも公私に渡り様々な協力をしていただきました。ここに感謝の意を表したいと思います。

また実験の準備、書類の作成等を通じて本研究を支えて下さいました田中喜代子氏にも感謝いたします。

参考文献

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. and Walker, J.E. *Nature* **370** (1994) 621-628
- Ames, B. N. and Hartman, P. E. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.* **28** (1963) 349-356
- Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology* (1993) Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience
- Rartsch, I., Schoneberg, C. and Grummt, I. *Mol. Cell. Biol.* **8** (1988) 3891-3897
- Bachman, M., Pfeifer, K., Schroder, H.-C. and Muller, W. E. G. *Cell* **60** (1990) 85-93
- Bear, D. G., Andrews, C. L., Singer, J. D., Morgan, W. D., Grant, R. A. and von Hippel, P. H. *Proc. Acad. Natl Sci. USA* **82** (1985) 1911-1915
- Bear, D. G., Hicks, P. S., Escudero, K. W., Andrews, C. L., McSwiggen, J. A. and von Hippel, P. H. *J. Mol. Biol.* **199** (1988) 623-635
- Bolivar, F. and Backman, K. *Methods Enzymol.* **68** (1979) 245
- Brennan, C. A. and Platt, T. *J. Biol. Chem.* **256** (1991) 17296-17305
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. *BioTechniques* **5** (1987) 376
- Bujalowski, W., Klonowska, M. M. and Jezewska, M. J. *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 31350-31358
- Bujalowski, W. and Klonowska, M. M. *Biochemistry* **34** (1993) 5888-5900
- Calva, E., Rosenvold, E. C., Szybalski, W. and Burgess, R. R. *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 11011-11016
- Calva, E. and Burgess, R. R. *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 11017-11022
- Das, A., Court, D. and Adhya, S. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **73** (1976) 1959-1963
- Davis, R. W., Botstein, D. and Roth, J. R. *Advanced Bacterial Genetics* (1980) Cold Spring

Harbor Laboratory Press

- Dolan, J. W., Marshall, N. F. and Richardson, J. P. *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 5747-5754
- Dombroski, A. J. and Platt, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988) 2538-2542
- Dombroski, A. J., Brennan, C. A. Spear, P. and Platt, T. *J. Biol. Chem.* **263** (1988a) 18802-18809
- Dombroski, A. J., LaDine, J. R., Cross, R. L. and Platt, T. *J. Biol. Chem.* **263** (1988b) 18810-18815
- Egelman, E. H., Yu, X., Wild, R., Hingorani, M. M. and Patel, S. S. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92** (1995) 3869-3873
- Finger, L. R. and Richardson, J. P. *Biochemistry* **20** (1981) 1640-1645
- Finger, L. R. and Richardson, J. P. *Biochemistry* **20** (1982a) 1640-1645
- Finger, L. R. and Richardson, J. P. *J. Mol. Biol.* **156** (1982b) 203-219
- Franklin, N. and Luria, S. E. *Virology* **15** (1961) 299-311
- Gamer, J., Bujard, H. and Bukau, B. *Cell* **69** (1992) 833-842
- Geiselmann, J., Seifried, S. E., Yager, T. D., Liang, C. and von Hippel, P. H. *Biochemistry* **31** (1992a) 111-121
- Geiselmann, J. G., Wang, Y., Seifried, S. E. and von Hippel, P. H. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **90** (1993) 7754-7758
- Geiselmann, J., Yager, T. D., Gill, S. C., Calmettes, P., Tardieu, A. and von Hippel, P. H. *Biochemistry* **31** (1992b) 121-132
- Geiselmann, J. and von Hippel, P. H. *Protein Science* **1** (1992) 850-860
- Gogol, E. P., Seifried, S. E. and von Hippel, P. H. *J. Mol. Biol.* **221** (1991) 1127-1138
- Gottesman, M., Oppenheim, A. and Court, D. *Cell* **29** (1982) 727-728
- Gottlieb, E. and Steiz, J. A. *EMBO J.* **8** (1989) 851-861
- Grummt, I., Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N. and Bachelleterie, J.-P. *Cell* **43** (1985) 801-810

- Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U. and Ohrlein, A. *Cell* **45** (1986) 837-846
- Hajdu, J., Bartha, F. and Friedrich, P. *Eur. J. Biochem.* **68** (1976) 373-383
- Hanahan, D. *J. Mol. Biol.* **166** (1983) 557-580
- Hochuli, E., Doebeli, H. and Schachner, A. *J. Chromatogr.* **411** (1987) 177-184
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Doebeli, H., Gentz, R. and Stueber, D. *Biothechnology* **6** (1988) 1321-1325
- Howard, B. H. and de Crombrughe, B. *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 2520-2524
- Inoko, H., Shigesada, K. and Imai, M. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **74** (1977) 1162-1166
- Kerppola, T.K. and Kane, C. M. *Biochemistry* **29** (1990) 269-278
- Kolter, R. and Yanofsky, C. *Annu. Rev. Genet.* **16** (1982) 113-134
- Laemmli, U.K. *Nature* **227** (1970) 680-685
- Li, J., Horwitz, R., McCracken, S. and Greenblatt, J. *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 6012-6019
- Li, J., Mason, S. W. and Greenblatt, J. *Genes & Dev.* **7** (1993) 161-172
- Lowery, C. and Richardson, J. P. *J. Biol. Chem.* **252** (1977) 1381-1385
- Lowery-Goldhammer, C. and Richardson, J. P. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **71** (1974) 2003-2007
- Martin, F. H. and Tinoco, I. *Nucleic. Acids Res.* **8** (1980) 2295-2299
- Maraia, R. J., Kenan, D. J. and Keene, J. D. *Mol. Cell. Biol.* **14** (1994) 2147-2158
- Matsumoto, Y., Shigesada, K., Hirano M. and Imai, M. *J. Bacteriol.* **166** (1986) 945-958
- Matthews, D. J. and Wells, J. A. *Science* **260** (1993) 1113-1117
- McSwiggen, J. A., Bear, D. G. and von Hippel, P. H. *J. Mol. Biol.* **199** (1988) 609-622
- Miloso, M., Limauro, D., Alifano, P., Rivellini, F., Lavitora, A., Gulletta, E. and Bruni, C. *B. J. Bacteriol.* **175** (1993) 8030-8037
- Miwa, Y., Horiguchi, T. and Shigesada, K. *J. Mol. Biol.* **254** (1995) 815-837
- Mori, H., Imai, M. and Shigesada, K. *J. Mol. Biol.* **210** (1989) 39-50

- Morrison, D. A. *Methods in Enzymology* **68** (1979) 326-331
- Oda, T. and Takanami, M. *J. Mol. Biol.* **71** (1972) 799-802
- Opperman, T. and Richardson, J.P. *J. Bacteriol.* **176** (1994) 5033-5043
- Pinkham, J. L. and Platt, T. *Nucl. Acids Res.* **11** (1983) 3531-3534
- Platt, T. and Richardson, J. P. *Transcriptional Regulation* (1992) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Quirk, P. G., Dunkley, Jr., E. A., Lee, P. and Krulwich, T. A. *J. Bacteriol.* **175** (1993) 647-654
- Richardson, J. P. and Conaway, R. *Biochemistry* **19** (1980) 4293-4299
- Richardson, J. P. *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 5760-5766
- Richardson, J. P. and Ruteshouser, E. C. *J. Mol. Biol.* **189** (1986) 413-419
- Roberts, J. W. *Nature* **224** (1969) 1168-1174
- Roberts, J. W. *Cell* **52** (1988) 5-6
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning* Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M. and Court, D. *J. Mol. Biol.* **176** (1984) 39-53
- Seifried, S. E., Easton, J. B. and von Hippel, P. H. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89** (1992) 10454-10458
- Shigesada, K. and Wu, C.-W. *Nucl. Acids Res.* **8** (1980) 3355-3369
- Shigesada, K., Tsurushita, N., Matsumoto, Y. and Imai, M. *Gene* **29** (1984) 199-209
- Stasiak, A., Tsaneva, I. R., West, S. C., Benson, C. J. B., Yu, X. and Egelman, E. H. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91** (1994) 7618-7622
- Stefano, J. E. *Cell* **36** (1984) 145-154
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. *J. Mol. Biol.* **189** (1986) 113-130
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. *Methods Enzimol.* **185**

(1990) 60-89

Sullivan, S. L., Ward, D. F. and Gottesman, M. E. *J. Bacteriol.* **174** (1992) 1339-1344

Sullivan, S. L. and Gottesman, M. E. *Cell* **68** (1992) 989-994

Tsurushita, N., Shigesada, K. and Imai, M. *J. Mol. Biol.* **210** (1989) 23-37

Yanofsky, C. *Nature* **289** (1981) 751-758

Yu, X., Jezewska, M. J., Bujalowski, W. and Egelman, E. H. *J. Mol. Biol.* **259** (1996) 7-14

Wang, Y. and von Hippel, P. H. *J. Biol. Chem.* **268** (1993a) 13940-13946

Wang, Y. and von Hippel, P. H. *J. Biol. Chem.* **268** (1993b) 13947-13955

Weber, K. and Osborn, M. *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 4406-4412

補遺

シンメトリーを区別するのに本研究では、二種類の架橋反応の時間変化を基に議論を行った。以下に各シンメトリーモデルにおける架橋反応の時間変化をコンピュータによって導いた方法の概略をしるす。

GENERAL MODEL

まず最初に最も基本的なモデルとしてプロトマー間の環境が交互に異なるモデルについて考える（スキーム1）。本研究において取り扱った全てのモデルは、このモデルの変形として扱うことが出来る。

二種類の異なる架橋部位 α および β における架橋反応の反応速度定数をそれぞれ $k\alpha$ および $k\beta$ とおく。本来架橋反応は二段階の反応であるが、初めの反応が終了すると二度目の反応は極めて速やかに進行するものと考えられる。したがって近似的に最初の反応の速度定数をもって架橋反応全体の定数とする。また一つの架橋部位に複数の架橋可能アミノ酸残基が存在する場合、それらの間での反応速度はほとんど同じであると考えられるし、生じる架橋産物の電気泳動における移動度もまた、ほとんど同じであると考えられるので、それら複数箇所の架橋反応の平均をもって反応速度定数とする。

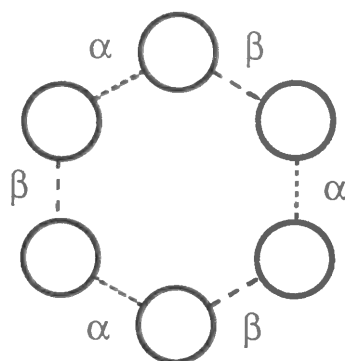
架橋反応はスキーム2に従って進行する。ここで X_{ij} は様々な反応段階における架橋産物を表す。 i はクロスリンクの回数、 j は同じ回数の架橋がかかった産物を区別するための番号である。 X_0 はクロスリンクの架かっていない六量体を表す。 X の後のカッコ内の表示は架橋されていない単量体 (I) および架橋された二量体 (II) から六量体 (VI) までの個数を示す。例えば $X_{23}(2I/II\alpha/II\beta)$ は二回架橋反応がおこった五種類の架橋産物のうちの一つで、その内訳は（すなわち SDS-PAGE に流したときどこにバンド

が出るか)、単量体が2、二量体が2である。

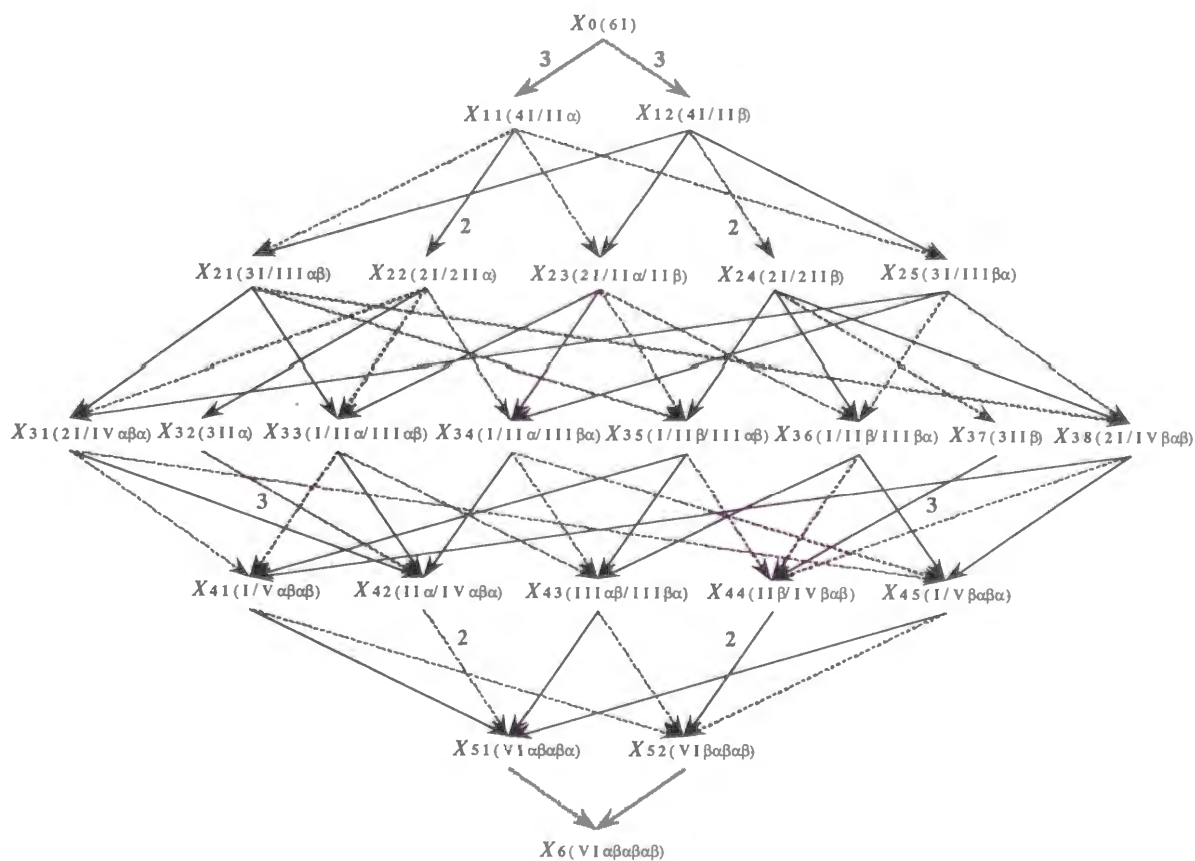
さらに二量体は架橋部位 α で架橋されたものが一つ、 β で架橋されたものが一つであることを示す。

また実線は速度定数 $k\alpha$ での架橋、破線は速度定数 $k\beta$ での架橋である。

この時、例えば X_{23} の架橋反応における時間変化について以下のように表現することができ。



スキーム1



スキーム2

二種類の異なる反応速度で進行する架橋反応の経路を実線と破線とで区別して示した。

$$\partial[X_{23}] / \partial t = k\alpha [X_{12}] + k\beta [X_{11}] - 2(k\alpha + k\beta) [X_{23}]$$

これを解くと、

$$X_{23} = 3 X_0 \{\exp(k\alpha\tau) - 1\} \{\exp(k\beta\tau) - 1\}$$

ここで、

$$X_0 = R_0 \exp\{-3(k\alpha + k\beta)\tau\}$$

$$\tau = \int_0^t C dt$$

であり、 R_0 は ρ の総濃度、 C は時刻 t における架橋剤の有効濃度である。

この X_{23} の構成要素は、単量体が2、 α で架橋された二量体が1、 β で架橋された二量体が1である。したがって、 X_{23} のみに着目するなら、

$$I = \Pi\alpha = \Pi\beta = (1/3) [X_{23}]$$

スキーム2にある X_0 から X_6 までについて同様に計算し、それぞれについて、構成要素である単量体から六量体までを算出し、足し合わせれば、単量体から架橋された六量体までを t の関数として表すことができる。計算結果は以下の通り。

$$R_I = R_0 \exp\{-(k\alpha + k\beta)\tau\}$$

$$R_{II} = R_0 \exp\{-(k\alpha + k\beta)\tau\} [\exp(-k\beta\tau) \{\exp(k\alpha\tau) - 1\} \\ + \exp(-k\alpha\tau) \{\exp(k\beta\tau) - 1\}]$$

$$R_{III} = 3 R_0 \exp\{-2(k\alpha + k\beta)\tau\} \{\exp(k\alpha\tau) - 1\} \{\exp(k\beta\tau) - 1\}$$

$$R_{IV} = 2 R_0 \exp\{-2(k\alpha + k\beta)\tau\} \{\exp(k\alpha\tau) - 1\} \{\exp(k\beta\tau) - 1\} [\exp(-k\beta\tau) \\ \{\exp(k\alpha\tau) - 1\} + \exp(-k\alpha\tau) \{\exp(k\beta\tau) - 1\}]$$

$$R_V = 5 R_0 \exp\{-3(k\alpha + k\beta)\tau\} \{\exp(k\alpha \tau) - 1\}^2 \{\exp(k\beta \tau) - 1\}^2$$

$$R_{VI} = R_0 \exp\{-3(k\alpha + k\beta)\tau\} \{\exp(k\alpha \tau) - 1\}^2 \{\exp(k\beta \tau) - 1\}^2 [3 \{\exp(k\alpha \tau) - 1\} \\ + 3 \{\exp(k\beta \tau) - 1\} + \{\exp(k\alpha \tau) - 1\} \{\exp(k\beta \tau) - 1\}]$$

D3 SYMMETRY MODEL

D3 シンメトリーモデルの場合は理論的には一つの接触面に同等の架橋が二カ所架かりうるが、本文中で議論したように、実際の電気泳動の結果は、大部分の架橋二量体が一回しかクロスリンクが架かっていないことを示している。したがって α で架橋の架かった二量体 ($II\alpha$) と β で架橋の架かった二量体 ($II\beta$) とは、それぞれ

$$R_{II\alpha} = R_0 \exp\{-(k\alpha + 2k\beta)\tau\} \{\exp(k\alpha \tau) - 1\}$$

$$R_{II\beta} = R_0 \exp\{-(2k\alpha + k\beta)\tau\} \{\exp(k\beta \tau) - 1\}$$

さらに、両者の比率は

$$R_{II\beta}/R_{II\alpha} = \exp\{(k\beta - k\alpha)\tau\} \{\exp(k\beta \tau) - 1\} / \{\exp(k\alpha \tau) - 1\}$$

と表せる。

また、三量体については、どのような組み合わせの架橋が生じて、その量比は常に一定で、

$$R_{III\alpha\beta} = R_{III\alpha\beta} = R_{III\alpha\beta} = R_{III\alpha\beta} = 1/4 R_{III}$$

単量体から架橋された六量体までの量は general model に示したものと全く同じである。

C3 SYMMETRY MODEL

C3 シンメトリーの場合も、単量体から架橋された六量体までの量は general model に示したものと全く同様である。

二種類の二量体の量も D3 シンメトリーの場合と同じである。

三量体については、二種類しか存在せず、その量は、

$$R_{III\alpha\beta} = R_{III\beta\alpha} = 1/2 R_{III}$$

C6 SYMMETRY MODEL

C6 シンメトリーモデルは、全てのプロトマー間が同じ環境の場合であり、これは general model においては、 α と β とが全く等しい場合の相当する。このとき、それぞれのプロトマー間は、電気泳動において二種類のバンドが検出されるわけだから二種類の架橋部位を持つはずである。このモデルにおいては、これら一つのプロトマー間における二種類の架橋部位の架橋反応速度定数をそれぞれ $k\alpha$ および $k\beta$ とする。一つのプロトマー間で架橋が起こる反応は $k\alpha$ と $k\beta$ とを加え合わせた速さで進行するはずだから、その反応の速度定数を $k = k\alpha + k\beta$ とすれば、単量体および架橋された二量体から六量体までの量は、以下のように書き表せる。

$$R_I = R_0 \exp(-2k \tau)$$

$$R_{II} = 2 R_0 \exp(-3k \tau) \{ \exp(k \tau) - 1 \}$$

$$R_{III} = 3 R_0 \exp(-4 k \tau) \{ \exp(k \tau) - 1 \}^2$$

$$R_{IV} = 4 R_0 \exp(-5k \tau) \{ \exp(k \tau) - 1 \}^3$$

$$R_V = 5 R_0 \exp(-6k \tau) \{ \exp(k \tau) - 1 \}^4$$

$$R_{VI} = 6 R_0 \exp(-6k \tau) \{ \exp(k \tau) - 1 \}^5 + R_0 \exp(-6k \tau) \{ \exp(k \tau) - 1 \}^6$$

また、

$$p = k\alpha / k$$

$$1-p = k\beta / k$$

とすれば、二種類の二量体の量比は、

$$R_{II\beta}/R_{II\alpha} = (1-p)/p$$

と表せる。さらに四種類の三量体の量比は、以下のように表せる。

$$R_{III\alpha\alpha} : R_{III\alpha\beta} : R_{III\beta\alpha} : R_{III\beta\beta} = p^2 : p(1-p) : p(1-p) : (1-p)^2$$

C3/6 SYMMETRY MODEL

このシンメトリーは、プロトマー間の環境が交互に異なるが、架橋はいずれの環境においても二カ所ずつ同じ場所でおこる。

C₆ シンメトリーの場合と同様に、各プロトマー間の二種類の架橋部位を α 及び β とする。二種類のプロトマー間での架橋反応の速度定数を k_1 および k_2 とする。これらはいずれも α と β とを合わせたものとする。このとき、単量体および架橋された二量体から六量体までの量は、

$$R_I = R_0 \exp\{-(k_1 + k_2)\tau\}$$

$$R_{II} = R_0 \exp\{-(k_1 + k_2)\tau\} [\exp(-k_2\tau)\{\exp(k_1\tau) - 1\} \\ + \exp(-k_1\tau)\{\exp(k_2\tau) - 1\}]$$

$$R_{III} = 3 R_0 \exp\{-2(k_1 + k_2)\tau\} \{\exp(k_1\tau) - 1\} \{\exp(k_2\tau) - 1\}$$

$$R_{IV} = 2 R_0 \exp\{-2(k_1 + k_2)\tau\} \{\exp(k_1\tau) - 1\} \{\exp(k_2\tau) - 1\} [\exp(-k_2\tau) \\ \{\exp(k_1\tau) - 1\} + \exp(-k_1\tau)\{\exp(k_2\tau) - 1\}]$$

$$R_v = 5 R_0 \exp\{-3(k_1 + k_2)\tau\} \{\exp(k_1 \tau) - 1\}^2 \{\exp(k_2 \tau) - 1\}^2$$

$$R_{VI} = R_0 \exp\{-3(k_1 + k_2)\tau\} \{\exp(k_1 \tau) - 1\}^2 \{\exp(k_2 \tau) - 1\}^2 [3 \{\exp(k_1 \tau) - 1\} \\ + 3 \{\exp(k_2 \tau) - 1\} + \{\exp(k_1 \tau) - 1\} \{\exp(k_2 \tau) - 1\}]$$

一方、生じる二種類の二量体のうち IIa は、プロトマー環境1における架橋 α の生じる割合を p ($0 < p < 1$)、環境2における架橋 α の生じる割合を q ($0 < q < 1$) とすれば、

$$R_{II\alpha} = p R_{II1} + q R_{II2}$$

と表せ、II β は

$$R_{II\beta} = (1-p) R_{II1} + (1-q) R_{II2}$$

と表すことができる。ただし、

$$R_{II1} = R_0 \exp\{-(k_1 + 2k_2)\tau\} \{\exp(k_1 \tau) - 1\}$$

$$R_{II2} = R_0 \exp\{-(2k_1 + k_2)\tau\} \{\exp(k_2 \tau) - 1\}$$

である。

時間に伴って変化する二種類の二量体の量比はこれらの式から求めることができる。

なお $p = q$ あるいは $k_1 = k_2$ の場合は

$$\left. \frac{R_{II\beta}}{R_{II\alpha}} \right|_{t \rightarrow 0} = \frac{(1-p) k_1 + (1-q) k_2}{p k_1 + q k_2}$$

$$\left. \frac{R_{II\beta}}{R_{II\alpha}} \right|_{t \rightarrow \infty} = \begin{cases} (1-p) p & (\text{for } k_1 > k_2) \\ (1-q) q & (\text{for } k_2 > k_1) \end{cases}$$

である。また三量体の量比は

$$R_{III\alpha\alpha} : R_{III\alpha\beta} : R_{III\beta\alpha} : R_{III\beta\beta} = p q : p (1-q) : q (1-p) : (1-p) (1-q)$$

プロトマー間の接触面が交互に異なるモデルでは、 $k\alpha$ と $k\beta$ (あるいは k_1 と k_2) が異なる場合、一般に架橋反応の中間段階では、両者が同じ場合に比べて、二量体と四量体が増加し、三量体と五量体が減少する傾向を示す。それらの比率は、

$$R_{II}/R_{III} = 1/3 [\exp(k\alpha\tau)/\{\exp(k\beta\tau) - 1\} + \exp(k\beta\tau)/\{\exp(k\alpha\tau) - 1\}]$$

$$R_{IV}/R_{III} = 2/3 [\{\exp(k\alpha\tau) - 1\}/\exp(k\beta\tau) + \{\exp(k\beta\tau) - 1\}/\exp(k\alpha\tau)]$$

これらは $k\alpha = k\beta$ の場合には、それぞれ 2/3、3/4 である。